

Departamento de Medicina Física y Farmacología  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Sección de Medicina

**“Estudio de los procesos celulares implicados en la  
infección por VIH-1: HDAC6 como nuevo factor de  
restricción”**

Memoria de tesis para aspirar al grado de doctor por la Universidad de La Laguna  
presentada por

**Laura de Armas Rillo**

Director de tesis: Agustín Valenzuela Fernández

La Laguna, 15 de Mayo de 2017

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

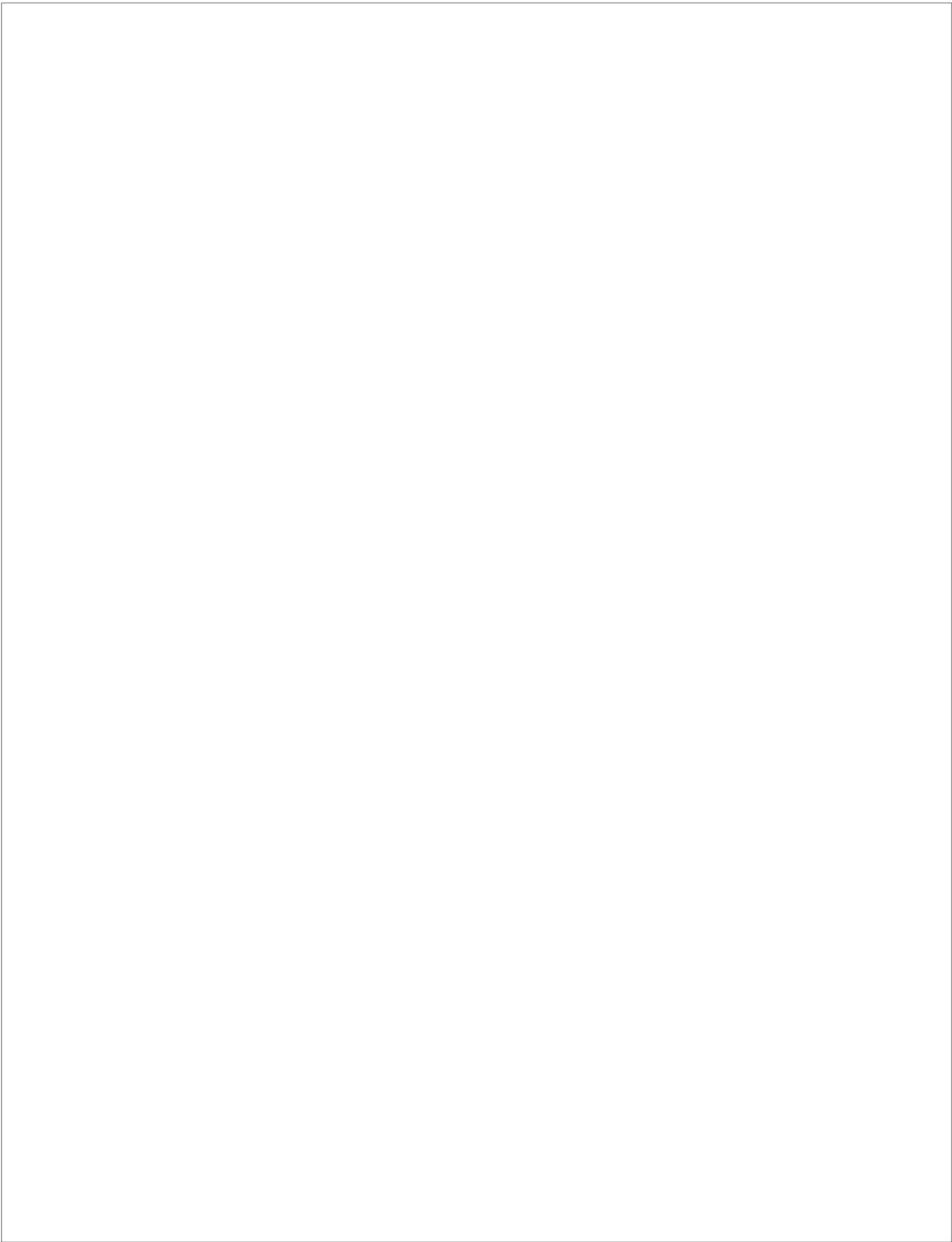
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos ProID20100020 de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias y SAF2011-24671 del Ministerio de Economía y Competitividad.

La autora de este trabajo, Laura de Armas Rillo, ha disfrutado de una beca de investigación BES-2012-053607 del programa FPI del Ministerio de Economía y Competitividad. Durante el desarrollo de este trabajo se realizaron dos estancias predoctorales de 3 y 2 meses de duración gracias al apoyo de las ayudas EEBB-I-15-09335 y EEBB-I-16-10977, respectivamente, del Ministerio de Economía y Competitividad dentro del marco del programa FPI.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



D. Agustín Valenzuela Fernández, Profesor Titular del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna

CERTIFICA:

que D. Laura de Armas Rillo ha realizado el trabajo titulado: **“Estudio de los procesos celulares implicados en la infección por VIH-1: HDAC6 como nuevo factor de restricción”**, que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de La Laguna

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en La Laguna, a 15 de mayo de 2017.

Dr. Agustín Valenzuela Fernández

Profesor Titular de Farmacología.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

D. Agustín Valenzuela Fernández, Profesor Titular del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna

CERTIFICA:

que D. Laura de Armas Rillo ha realizado el trabajo titulado: **“Estudio de los procesos celulares implicados en la infección por VIH-1: HDAC6 como nuevo factor de restricción”**, que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de La Laguna

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en La Laguna, a 15 de mayo de 2017.



Dr. Agustín Valenzuela Fernández  
Profesor Titular de Farmacología.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha: 01/06/2017 15:58:11
AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	02/06/2017 11:29:41
ERNESTO PEREDA DE PABLO UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	06/06/2017 19:00:01

Como muestra de agradecimiento dedico este trabajo a mis primeros compañeros, Laura y Jonathan, por haberme acompañado en mis inicios y, con paciencia, haberme enseñado mucho de lo que sé. A Serena, una excepcional persona, fue un placer haber compartido contigo trabajo y experiencias. Con muy especial sentimiento y agradecimiento a Soledad, porque durante muchos años fuiste mi apoyo, mi compañera de lágrimas y risas, muchas risas, y porque sin tu ayuda este trabajo, indudablemente, no sería lo que es.

A mis padres, Eduardo y Divina, por su dedicación incondicional a todo lo que emprendo y finalmente a Jony, mi amigo y compañero, por resistir y ser mi punto de apoyo en la parte más complicada de este trabajo, la emocional.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

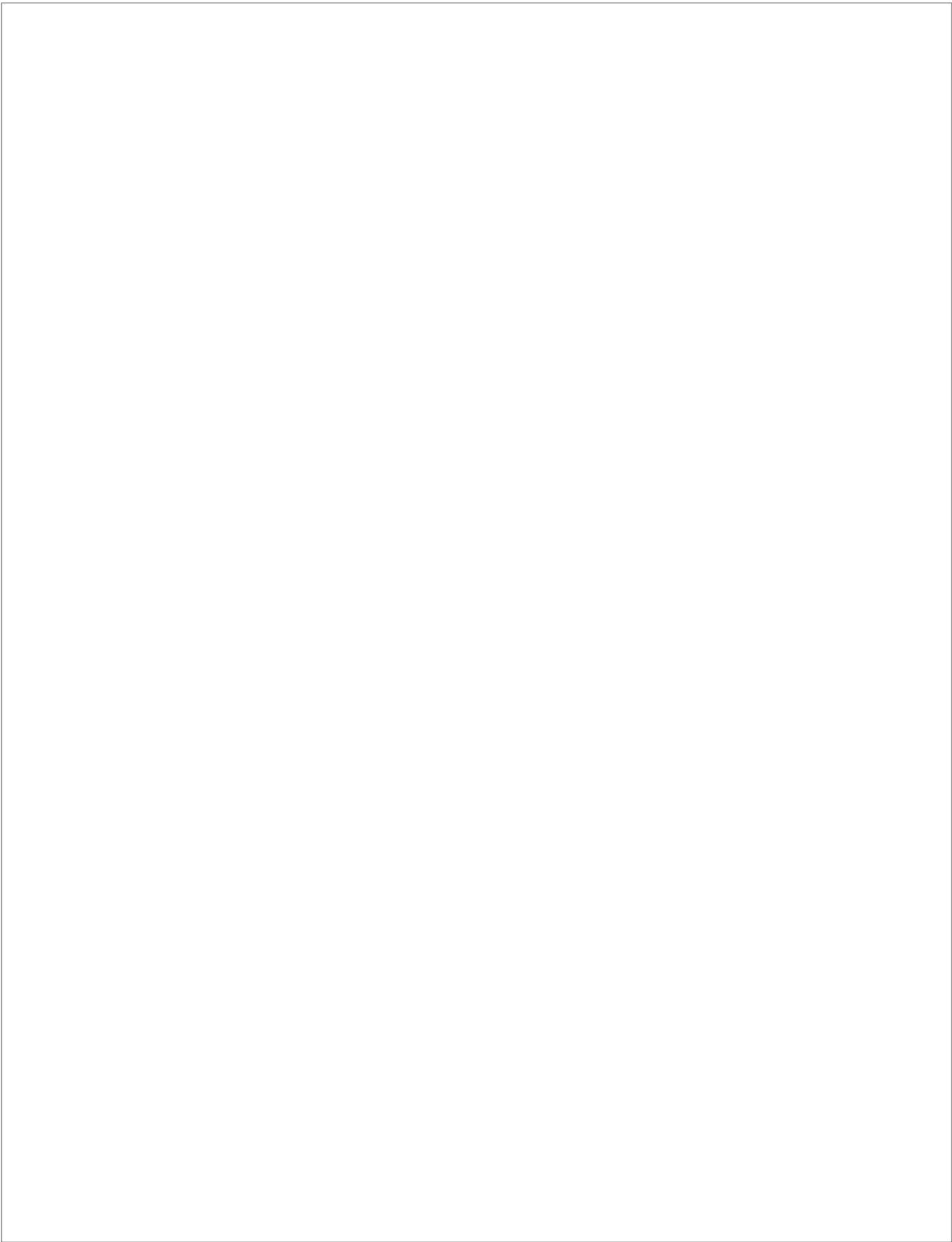
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

<b>0 RESUMEN / ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1.1 VIH. El virus de la inmunodeficiencia humana.....	7
1.1.1 El SIDA como enfermedad y descubrimiento del VIH.....	7
1.1.2 Estructura y ciclo de vida del VIH.....	9
1.1.3 Proteínas accesorias del VIH.....	12
1.2 Un paso más en la inmunidad innata: los factores de restricción.....	13
1.2.1 APOBEC3G y familia APOBEC.....	15
1.2.2 Función anti-retroviral de APOBEC3G.....	17
1.3 El factor de infectividad viral, Vif.....	20
1.3.1 Papel de Vif en el ciclo viral.....	21
1.4 Pr55-Gag, origen de la estructura del virus.....	25
1.4.1 Ensamblaje del virión a partir de Pr55-Gag.....	26
1.4.2 Papel de la Ubiquitina en el ensamblaje y maduración del virión.....	28
1.5 Una Histona Desacetilasa diferente: HDAC6.....	31
1.5.1 Familia de las Histonas Desacetilasa.....	31
1.5.2 Características de HDAC6 y su función en la célula.....	33
1.5.3 Autofagia y participación de HDAC6 en el proceso.....	35
<b>2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 Materiales.....	45
3.1.1 Anticuerpos.....	45
3.1.2 Reactivos.....	46
3.1.3 Soluciones de trabajo.....	48
3.1.4 Medios y suplementos para los cultivos celulares.....	50

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

3.1.5 Líneas celulares.....	50
3.1.6 Constructos de ADN.....	52
3.1.6.1 Plásmidos virales.....	52
3.1.6.2 Plásmidos de proteínas celulares.....	54
3.1.7 Vectores de expresión.....	57
3.1.8 Oligos de interferencia.....	58
3.2 Métodos.....	58
3.2.1 Transfección de cultivos celulares.....	58
3.2.2 Western Blot.....	59
3.2.3 Ensayos de poliubiquitinación.....	60
3.2.4 Inhibición de proteasoma y de la autofagia.....	60
3.2.5 Inmunoprecipitación.....	61
3.2.6 Inmunofluorescencia.....	61
3.2.7 Producción de partículas virales.....	62
3.2.7.1 Producción de pseudovirus de VIH.....	62
3.2.7.2 Producción de virus de VIH.....	63
3.2.8 ELISA de p24.....	63
3.2.9 Ensayos de infección.....	64
3.2.9.1 Ensayo de infección Luciferasa.....	64
3.2.9.2 Ensayo de infección de $\beta$ -Galactosidasa.....	65
3.2.9.3 Cálculo de la TCID50/mL.....	65
3.2.10 Detección de proteínas en los pseudovirus nacientes.....	66
3.2.11 Análisis estadístico de los datos y representación.....	67
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
4.1 El complejo HDAC6/APOBEC3G regula la infectividad de VIH-1 induciendo la degradación autofágica de Vif.....	71
4.1.1 Experimentos preliminares.....	71
4.1.2 HDAC6 no afecta a la estabilidad de APOBEC3G.....	75
4.1.3 HDAC6 protege A3G promoviendo la degradación de Vif con importante implicación del dominio BUZ.....	76

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

4.1.4	HDAC6 y APOBEC3G interactúan de manera constitutiva.....	78
4.1.5	HDAC6, A3G y Vif pueden interactuar de manera simultánea.....	84
4.1.6	HDAC6 afecta a los niveles de ubiquitinación de A3G promovidos por Vif.....	87
4.1.7	HDAC6 media la degradación de Vif independientemente de la interacción entre Vif y A3G.....	89
4.1.8	La degradación de Vif promovida por HDAC6 depende de su dominio BUZ.....	91
4.1.9	HDAC6 induce la degradación de Vif de manera dependiente de su dominio BUZ y de su capacidad desacetilasa.....	94
4.1.10	HDAC6 induce la degradación de Vif vía autofagia.....	96
4.1.11	HDAC6 afecta a la infectividad de VIH.....	98
4.2	HDAC6 afecta a la producción de las partículas virales mediante la desestabilización de la proteína Pr55-Gag.....	103
4.2.1	HDAC6 modula negativamente la estabilidad de la proteína Pr55-Gag.....	103
4.2.2	HDAC6 no afecta a la infectividad del VIH como consecuencia de la inestabilidad de Pr55-Gag.....	104
4.2.3	HDAC6 afecta a la localización en agregados de Pr55-Gag en la célula.....	106
4.2.4	La actividad desacetilasa de HDAC6 es indispensable para su efecto pro-degradativo de Pr55-Gag.....	110
4.2.5	La autofagia es la vía degradativa que involucra a HDAC6 para la degradación de Pr55-Gag.....	112
4.2.6	HDAC6 afecta a la estabilidad de Pr55-Gag procedente de un provirus pNL4.3.....	117
4.2.7	La ubiquitinación de la región p6 junto con otra de las regiones C terminal de Pr55-Gag resulta esencial para el reconocimiento por parte de HDAC6.....	121
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>125</b>
5.1	Después de 30 años, ¿sigue habiendo algo que descubrir sobre el VIH?.....	127
5.2	Ayudando a la caracterización de HDAC6.....	129
5.3	HDAC6 afecta a la infectividad del VIH promoviendo la degradación de Vif y protegiendo así a A3G.....	132
5.3.1	HDAC6 y Vif interactúan independientemente de la interacción con A3G.....	134
5.3.2	HDAC6 promueve la inestabilidad de Vif haciendo uso de la ruta autofágica de degradación.....	138

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

5.3.3 Como consecuencia de la degradación de Vif, HDAC6 afecta a la infectividad de las nuevas partículas virales.....	140
5.4 HDAC6 modula negativamente la estabilidad de la proteína estructural Pr55-Gag..	141
5.4.1 El dominio de unión a Ubiquitina, BUZ y la actividad desacetilasa de HDAC6 resultan indispensables para la acción pro-degradativa contra Pr55-Gag.....	144
5.4.2 HDAC6 hace uso de la ruta autofágica para promover la degradación de Pr55-Gag. ....	146
5.4.3 La proteína Pr55-Gag de origen proviral resulta igualmente sensible a la inestabilidad promovida por HDAC6.....	149
5.5 HDAC6 como un nuevo factor de restricción anti-VIH.....	152
<b>6 CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>	<b>155</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO I - Publicaciones resultantes del trabajo de Tesis Doctoral.....</b>	<b>185</b>
<b>ANEXO II - Otros trabajos publicados durante el periodo formativo.....</b>	<b>217</b>
<b>ANEXO III - Memoria de los trabajos realizados durante la estancia pre-doctoral en la Universidad de Estrasburgo. Francia.....</b>	<b>221</b>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

Figura 1.1: Evolución clínica de la infección por el VIH-1 en ausencia de tratamiento..... 8

Figura 1.2: Mapa mundial infectados con el VIH..... 9

Figura 1.3: Dibujo esquemático de una partícula viral del VIH..... 10

Figura 1.4: Ciclo viral del VIH en su célula diana..... 11

Figura 1.5: Genoma del VIH-1..... 12

Figura 1.6: Familia de las proteínas APOBEC..... 16

Figura 1.7: APOBEC3G..... 18

Figura 1.8: Mecanismo de acción de A3G..... 19

Figura 1.9: Estructura de la proteína Vif..... 20

Figura 1.10: Mecanismo de acción de Vif y estructura de la proteína..... 21

Figura 1.11: Mecanismos principales de inhibición de A3G por parte de Vif..... 22

Figura 1.12: Representación de la proteína Pr55-Gag y su procesamiento..... 26

Figura 1.13: Ensamblaje del virión..... 27

Figura 1.14: Esquema de la familia HDAC..... 31

Figura 1.15: Esquema de la proteína HDAC6..... 33

Figura 1.16: Función de HDAC6 en la formación de agrosomas..... 35

Figura 1.17: Esquema del proceso de la autofagia..... 37

Figura 4.1: Efecto de la proteína viral Vif sobre A3G..... 72

Figura 4.2: Co-inmunoprecipitación entre A3G y Vif..... 73

Figura 4.3: Estudio de la expresión y funcionalidad de HDAC6 recombinante..... 74

Figura 4.4: Estudio de la estabilidad de A3G en co-expresión con HDAC6..... 76

Figura 4.5: Estudio de la afectación de HDAC6 y HDAC6-ΔBUZ sobre A3G y Vif..... 78

Figura 4.6: Co-inmunoprecipitaciones de A3G y HDAC6..... 80

Figura 4.7: Co-inmunoprecipitación de los constructos de HDAC6 y A3G..... 81

Figura 4.8: Microscopía confocal de la sobre-expresión de A3G-3xHA y del HDAC6 endógeno. 83

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## Índice de figuras

---

Figura 4.9: Microscopía confocal de sobre-expresión de A3G-3xHA y HDAC6.....	84
Figura 4.10: Co-inmunoprecipitaciones entre A3G, Vif y dos constructos de HDAC6.....	86
Figura 4.11: Estudio de los niveles de ubiquitinación de A3G.....	88
Figura 4.12: Ensayo de degradación de Vif en presencia de dos mutantes de A3G.....	91
Figura 4.13: Estudio del efecto degradativo de HDAC6 sobre Vif en ausencia de A3G.....	93
Figura 4.14: Estudio de la estabilidad de Vif en condiciones de silenciamiento de HDAC6.....	94
Figura 4.15: Estudio de la implicación de las diferentes regiones de HDAC6 sobre Vif.....	96
Figura 4.16: Estudio de la inhibición del proteasoma y de la autofagia.....	98
Figura 4.17: Ensayos de infección por el método de la $\beta$ -Galactosidasa en células HeLaP5.....	100
Figura 4.18: Ensayo de infección por el método de la enzima Luciferasa en CEM.NKR-CCR5...	102
Figura 4.19: Estudio bioquímico del efecto pro-degradativo de Gag en presencia de HDAC6..	104
Figura 4.20: Ensayo de infección por el método de la Luciferasa en CEM.NKR-CCR5.....	106
Figura 4.21: Ensayo control del efecto de HDAC6 sobre Gag-GFP.....	108
Figura 4.22: Estudio del patrón de agregación de Gag.....	109
Figura 4.23: Implicación de los dominios de HDAC6 en el efecto pro-degradativo sobre Gag.	112
Figura 4.24: Caracterización de la respuesta de p62 y LC3 (I y II) a un bloqueo de la autofagia post-activación o basal en células 293T.....	114
Figura 4.25: Estudio de la respuesta pro-degradativa de HDAC6 sobre Gag en condiciones de bloqueo del proteasoma y la autofagia.....	116
Figura 4.26: Estudio del bloqueo de la degradación de Gag promovida por HDAC6 por la paralización del proceso autofágico.....	117
Figura 4.27: Caracterización de la acción de afectación de Gag de HDAC6 de un provirus.....	119
Figura 4.28: Ensayos de infección y ELISA de p24 de virus producidos en presencia de HDAC6. ....	120
Figura 4.29: Estudio de las regiones de Gag ubiquitinables que le otorgan sensibilidad al efecto pro-degradativo de HDAC6.....	123

---

II

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

3-MA	3 metiladenina
A/dA	Adenosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNss	ADN <i>single strand</i> , ADN de cadena simple
ApoB	Apolipoproteína
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic</i> , enzima catalítica de edición del ARNm de la ApoB
APOBEC3G/A3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G, enzima catalítica de edición del ARNm de la ApoB subunidad 3G
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN interferente
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN transferencia
Baf. A	Bafilomicina A
BUZ	<i>Bound to ubiquitin zinc finger</i> , unión a ubiquitina en dedos de zinc
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> , albúmina de suero bovino
BST-2	<i>Bone marrow stromal antigen-2</i> , antígeno estromal de la médula-2
C/dC	Citosina/desoxicitosina
CA	Cápside
CCR5	C-C chemokine receptor type 5, receptor de quimioquinas C-C tipo 5
CD4/8	<i>Cluster of differentiation 4/8</i> , cúmulo de diferenciación 4/8
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> , receptor de quimioquinas C-X-C tipo 4
dNTPs	Desoxinucleotidos
DMSO	Dimetil sulfóxido
EIAV	<i>Equine infectious anemia virus</i> , virus de anemia infecciosa equina
Env	<i>Envelope</i> , complejo de las proteínas virales de la envuelta

I

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## Abreviaturas

---

ESCRT	<i>Endosomes sorting complexes required for transport</i> , complejo endosomal para el transporte
Fv1	<i>Friend virus susceptibility 1</i>
G/dG	Guanina
Gag	<i>Group-specific antigen</i> , antígeno específico de grupo
Gag-Pol	Poliproteína vírica compuesta por Gag y Pol
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , proteína verde fluorescente
HA	Hemaglutinina
HATs	Histonas acetiltransferasas
HDAC6	Histona deacetilasa 6
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i> , proteína de choque térmico 90
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , peroxidasa de rábano
HTLV-III	<i>Human T-lymphotropic virus-III</i> , virus linfotrópico humano de células T-III
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IN	Integrasa
LAV	<i>Lymphadenopathy-associated virus</i> , virus asociado a linfadenopatía
LC3-I/LC3-II	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3</i> , cadena ligera de proteína asociada a microtúbulos 3
LINEs	Long Interspersed Nuclear Elements, elementos largos intercalados nucleares
LTR	<i>Long terminal repeat</i> , largas secuencias repetidas en los extremos
MA	Matriz
MHC-I/II	<i>Major histocompatibility complex</i> , complejo principal de histocompatibilidad
MLV	<i>Murine leukemia virus</i> , virus de la leucemia murina
NC	Nucleocápside

---

II

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

NIH	<i>National Institute of Health</i>
Nef	<i>Negative regulatory factor</i> , factor de regulación negativo
NES	<i>Nuclear export signal</i> , señal de exporte nuclear
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> , señal de localización nuclear
ONUSIDA	Programa de las Naciones Unidas sobre el sida
ORF	<i>Open reading frame</i> , marco de lectura abierto
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , células mononucleares de sangre periférica
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampón de fosfato salino
PIC	<i>Pre-integration complex</i> , complejo de preintegración
Pol	Polimerasa
PR	Proteasa
RER	Retículo endoplasmático rugoso
Rev	<i>Regulator of virion</i> , regulador de la expresión viral
RT	Retrotranscriptasa
SAMHD1	<i>SAM domain and HD domain-containing protein 1</i> , proteína 1 que contiene los dominios SAM y HD
SERINC5/3	<i>Serine incorporator 5/3</i> , incorporador de serina 5/3
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SINEs	<i>Short Interspersed Nuclear Elements</i> , elementos cortos intercalados nucleares
SP1/2	<i>Spacer peptides 1/2</i> , péptido espaciador 1/2
Tat	<i>Trans-activator transcription</i> , transactivador de la transcripción viral
TBS-t	<i>Tris-buffered saline Tween</i> , tampón tris salino Tween
TRIM5 $\alpha$	<i>Tripartite motif-containing protein 5</i> , proteína que contiene motivo tripartido 5
U/dU	Uracilo, desoxiuracilo
Ub	Ubiquitina

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## Abreviaturas

---

VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Vif	<i>Viral infectivity factor</i> , factor de infectividad viral
VIS	Virus de la inmunodeficiencia en simios
VLPs	<i>Viral like particles</i> , partículas similares a virus
Vpr	<i>Viral protein R</i> , proteína viral R
Vpu	<i>Viral protein U</i> , proteína viral U
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i> , virus de la estomatitis vesicular
Zn <sup>2+</sup>	Ión de Zinc

---

IV

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

0

## RESUMEN / ABSTRACT

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

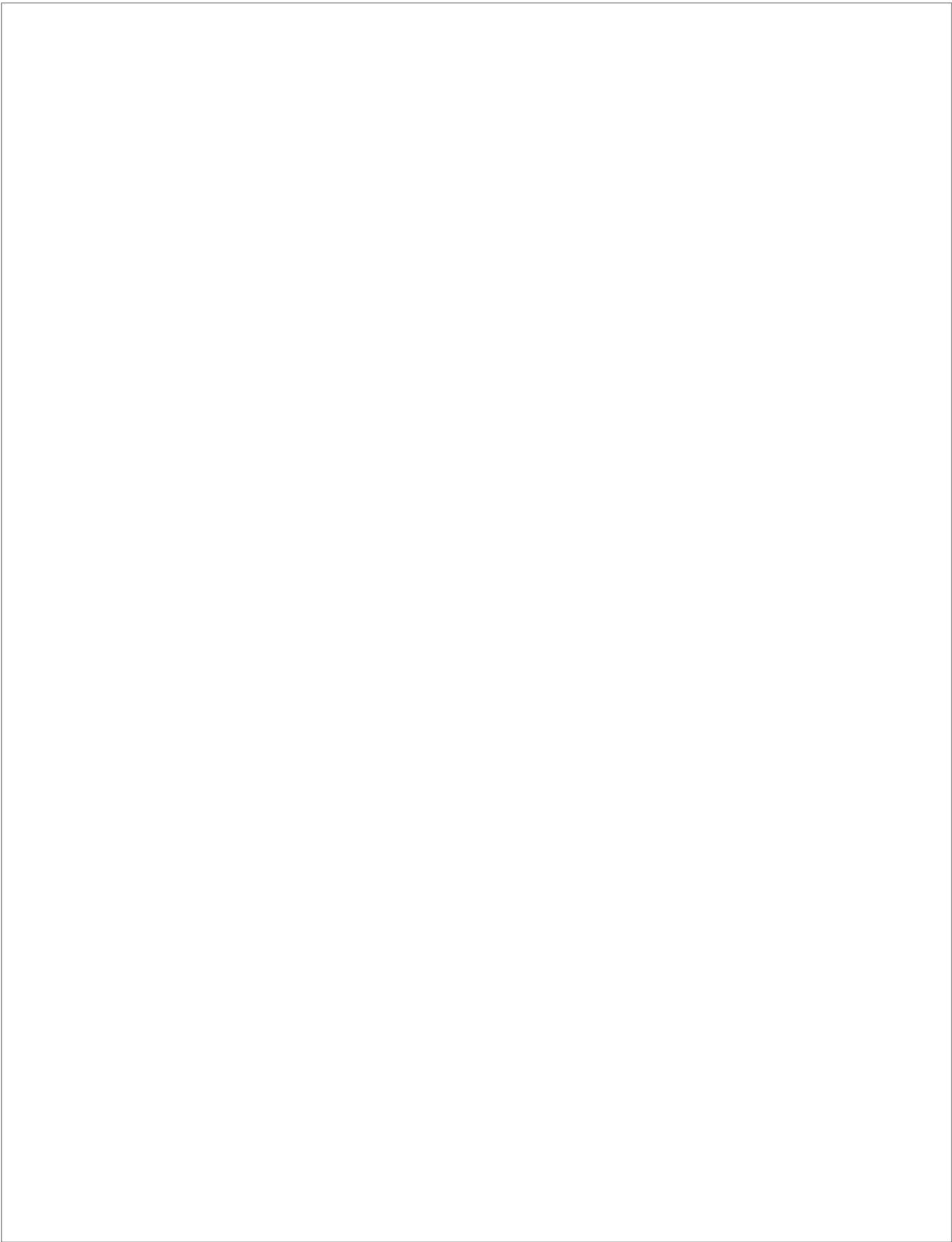
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

RESUMEN

En la actualidad 37 millones de personas viven infectadas con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), siendo éste el causante de la muerte de 1,2 millones de personas al año. Esto significa que, a pesar de los avances en el tratamiento y la prevención, el sida continúa siendo una enfermedad con un gran impacto en la población a nivel mundial.

El descubrimiento de los factores de restricción anti-retrovirales, que presentes en nuestras células, combaten la presencia del virus, además de la caracterización de las diversas proteínas del virus encargadas de contrarrestar la acción de estos factores, ha abierto un área de conocimiento de gran interés. El tándem más estudiado en este sentido es el conformado por APOBEC3G y Vif. La proteína viral Vif logra, mediante la inducción de poli-ubiquitinación, promover la degradación proteasómica de APOBEC3G, un factor de restricción que afecta gravemente a la capacidad infectiva del VIH. Además, la proteína estructural del VIH-1, Pr55-Gag, también hace uso de la ubiquitinación para llevar a cabo su función. Pr55-Gag requiere de ser ubiquitinada para lograr anclarse eficientemente a la membrana plasmática, agregarse en la zona de salida del virus y que se produzca la maduración correcta de la partícula viral. En este contexto, donde la ubiquitinación es un proceso relevante en el ciclo viral, este trabajo de tesis doctoral se centra en el estudio de la proteína celular HDAC6.

HDAC6 presenta una gran capacidad de unir Ubiquitina y juega un papel esencial en los procesos de degradación de agregados ubiquitinados en la célula. En este trabajo describimos a HDAC6 como un factor de protección de APOBEC3G mediante dos acciones. Por un lado, evita su degradación protegiéndolo de manera competitiva frente a Vif, y por otro, provoca la degradación de Vif vía autofagia.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

También describimos que HDAC6 reconoce las proteínas Pr55-Gag ubiquitinadas en su región C terminal, provocando su degradación también vía autofagia, evitando una producción eficiente de partículas virales.

En este escenario, y frente a la necesidad de continuar con la búsqueda de nuevos factores de lucha contra esta enfermedad, además de ampliar los conocimientos existentes sobre el VIH y los mecanismos existentes de la célula de lucha contra el virus, nosotros proponemos HDAC6 como un excelente candidato a estudio como un nuevo factor de restricción anti-VIH.

#### ABSTRACT

Nowadays, 37 million people are infected with the Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1), this virus being responsible for the death of 1.2 million people every year. This means that, despite advances in treatment and prevention, AIDS remains a disease with a great impact over the world population.

The discovery of the antiretroviral restriction factors that are present in our cells, which combat the virus infection, and the characterization of viral proteins whose function is counteracting the action of these factors, has opened a great area of knowledge. The proteins most studied in this context are APOBEC3G and Vif. APOBEC3G is a restriction factor that gravely affects the infectivity of HIV and the viral protein Vif promotes the proteasomal degradation of APOBEC3G by polyubiquitination. Furthermore, the structural protein of HIV, Pr55-Gag, needs ubiquitination to accomplish its function. Pr55-Gag requires to be ubiquitinated in order to dock to the plasma membrane, at the budding place, and to achieve the successful maturation of the viral particle. In this context, where ubiquitination is a relevant process in viral cycle, this study focuses about HDAC6. HDAC6 is a cellular protein and has a great ability to bind ubiquitin and plays an essential role in the degradation of ubiquitinated aggregates. We describe here how HDAC6 acts as an

APOBEC3G protection factor by two actions. HDAC6 binds APOBEC3G, competing against Vif, and avoids its degradation and, also, HDAC6 promotes degradation of Vif via autophagy . We also describe that HDAC6 recognizes the ubiquitinated Pr55-Gag promoting their degradation via autophagy.

Due to a need to continue with the search of new factors to combat this disease, and to extend knowledge about HIV and mechanisms of the cell to flight against the virus, we propose HDAC6 as an excellent candidate for study it as a new anti-HIV restriction factor.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

# 1

## INTRODUCCIÓN

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

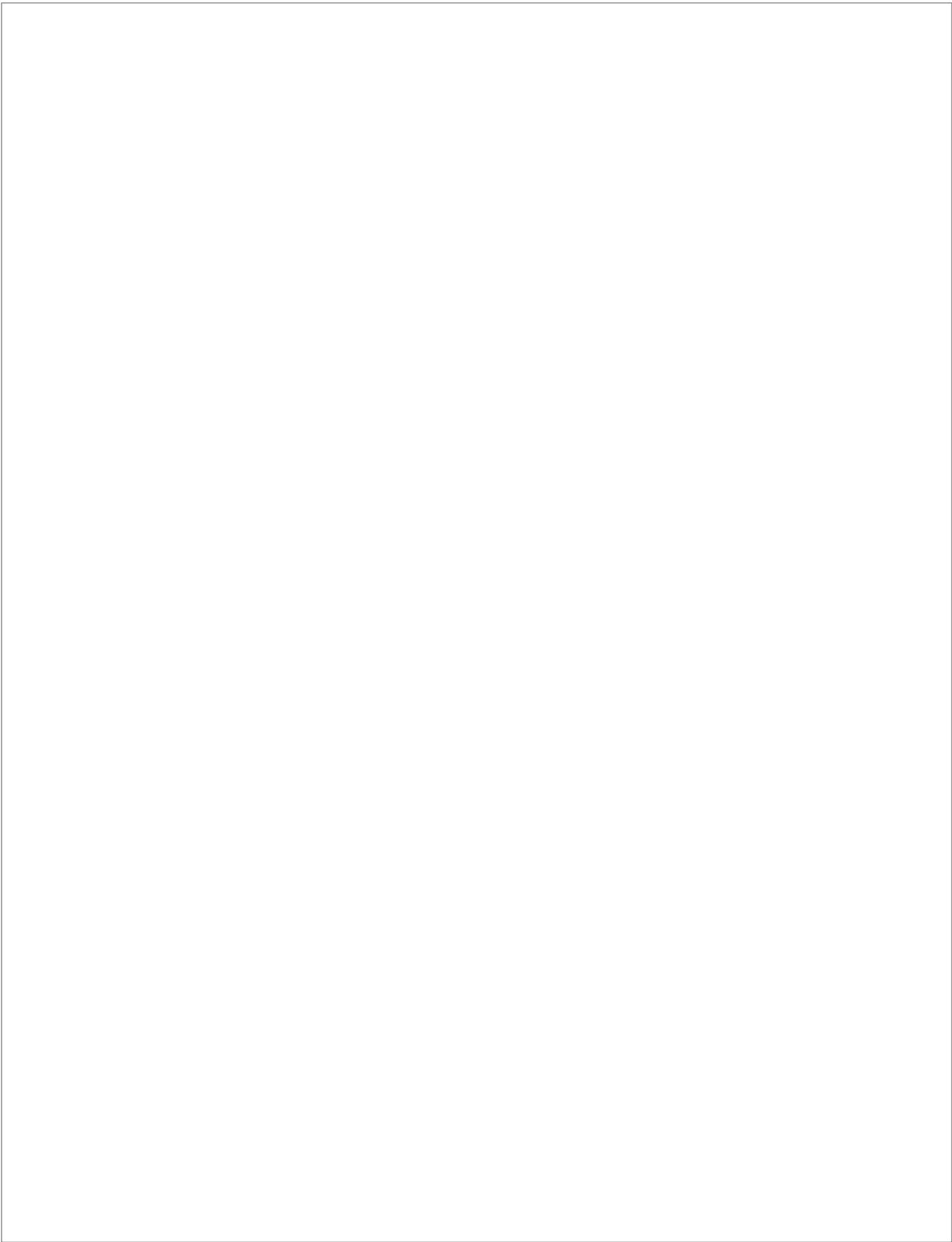
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## 1.1 VIH. El virus de la inmunodeficiencia humana.

### 1.1.1 El SIDA como enfermedad y descubrimiento del VIH

A principios de los años 80 fueron publicados en Estados Unidos un conjunto de casos clínicos de individuos que, aparentemente sanos, presentaban casos graves de infecciones pulmonares (1) y sarcoma de Kaposi (2). Estas enfermedades e infecciones oportunistas son comunes en pacientes inmunodeprimidos y aunque no existía una razón aparente para ello, todos estos pacientes tenían en común una gran depleción de linfocitos CD4<sup>+</sup> (3). Por ello se denominó a esta nueva enfermedad como síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA (4).

En un escenario de evolución de la infección por VIH en ausencia de tratamiento, la clínica que se observa consiste en un aumento de la carga viral en sangre en el momento de la infección. Posteriormente ésta disminuye, en ocasiones a niveles casi indetectables y se mantiene estable en el tiempo. En este punto se entra en una fase de duración variable en la que el individuo no presenta signos clínicos de la infección. Finalmente, entramos en la fase tardía de la infección donde hay un aumento drástico de la carga viral en sangre acompañada de una depleción de los linfocitos CD4<sup>+</sup> (principal célula diana del virus). En este estado de inmunodepresión el individuo presenta los signos clínicos típicos de la infección, las enfermedades asociadas y las infecciones oportunistas típicas (5,6), y es en este punto cuando se establece la entrada en la fase SIDA de la infección (Fig.1.1).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## INTRODUCCIÓN

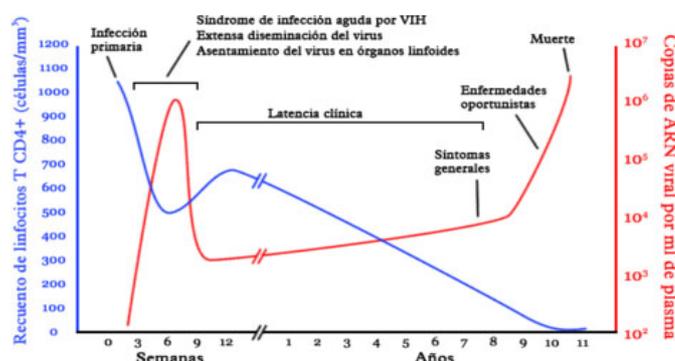


Figura 1.1: Evolución clínica de la infección por el VIH-1 en ausencia de tratamiento.

En la primoinfección hay un descenso de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (línea azul), acompañado de un aumento de la carga viral en sangre (línea roja), en este momento se produce la infección en los órganos linfoides y se establece el reservorio viral en el individuo. Posteriormente, sigue una fase asintomática, llamada de latencia clínica, de duración variable con un descenso progresivo de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Finalmente, la infección desemboca en la fase sida con un descenso dramático de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, una alta carga viral en sangre y la aparición de las enfermedades oportunistas típicas.

Figura modificada de (342)

En 1983 un grupo de investigación francés dirigido por Dr. Luc Montangier y otro grupo estadounidense dirigido por Dr. Robert Gallo publicaron el aislamiento de un retrovirus presente en una muestra de un paciente con sida (7,8). Aunque cada grupo propuso un nombre diferente, tres años más tarde, en 1986, y tras verificarse que se trataba del mismo virus pasó a denominarse Virus de la Inmunodeficiencia Humana, VIH (9) y comenzaron las investigaciones sobre el virus como el agente etiológico del SIDA.

Años más tarde fue descubierto otro subtipo de este retrovirus, el VIH-2 (10,11) también con capacidad patogénica pero menos virulento, que presenta una capacidad infectiva mucho menor y que se encuentra pobremente expandido a nivel mundial (12,13). El VIH-1 es el causante de la pandemia mundial de SIDA que se ha cobrado desde su descubrimiento hasta la actualidad más de 40 millones de vidas (14,15). Este trabajo está centrado en el estudio de mecanismos y factores

que implican principalmente al VIH-1 por lo que de manera simplificada nos referiremos a él como VIH, en caso contrario se especificará.

A pesar del desarrollo de diferentes terapias no existe hoy en día una cura o vacuna contra este patógeno y los tratamientos actuales tan solo logran convertirlo en una enfermedad crónica que sigue lastrando la vida de las personas infectadas. Ya que actualmente unos 37 millones de personas conviven con el VIH, según datos del año 2015, publicados en el último informe del año 2016 (**Fig.1.2**) (16), la investigación en lograr entender mejor el ciclo vital de este virus y de cómo interactúa con el sistema inmune y su capacidad para evadirlo sigue siendo un potente foco de interés.

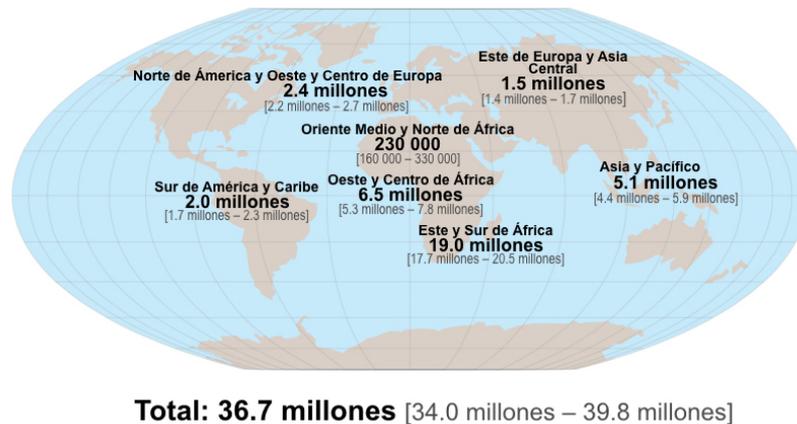


Figura 1.2: Mapa mundial infectados con el VIH

Se indica el número aproximado de individuos infectados con el VIH-1 por regiones en el año 2015

Figura modificada de (16).

### 1.1.2 Estructura y ciclo de vida del VIH

El VIH es un lentivirus que pertenece a la familia *Retroviridae* (17) e infecta principalmente células del sistema inmune, en concreto linfocitos T CD4<sup>+</sup>, macrófagos y células dendríticas, siendo su receptor en la célula el propio CD4

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

(*cluster of differentiation 4*) y usando como correceptor los receptores de quimiocinas CXCR4 o CCR5 (18–20). Dependiendo de su afinidad por el co-receptor se clasifican como virus con tropismo X4 o R5, respectivamente (21). El VIH presenta una envoltura lipídica que adquiere durante su salida de la célula infectada y un cuerpo interior de naturaleza proteica de morfología cónica truncada. Dentro de esta estructura se encuentra el material genético del virus, compuesto por dos moléculas de ARN positivas, homólogas pero no idénticas, además de otras proteínas importantes para su ciclo vital (**Fig.1.3**) (22).

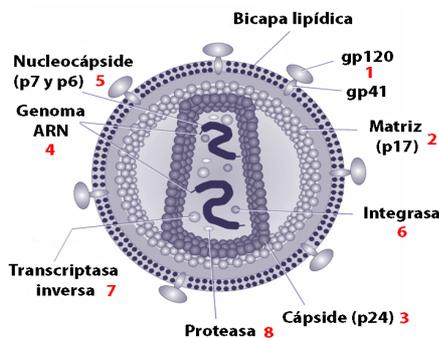


Figura 1.3: Dibujo esquemático de una partícula viral del VIH.

En la membrana lipídica y expuestas hacia el exterior, las proteínas de la envoltura forman trímeros de heterodímeros de la proteína extracelular gp120 y proteína transmembrana gp41 (1). Estabilizando la envoltura se encuentra la proteína Matriz (MA) o p17 (2). El cuerpo viral o cápside, lo compone la proteína Cápside (CA) o p24 (3). En el interior, está el genoma viral (4) y protegiéndolo la proteína Nucleocápside (NC) o p6 (5). En este espacio también encontramos otras proteínas como son la Integrasa (IN) (6), la Retrotranscriptasa (RT) (7), la Proteasa (PR) (8), entre otras.

Figura modificada de (348)

La entrada del virus en la célula diana se produce por uniones específicas de las proteínas de su envoltura al receptor y co-receptor celular, lo que desencadena tanto cambios conformacionales en las proteínas víricas como alteraciones en el citoesqueleto celular. Estos cambios permiten la formación del poro de fusión y la consecuente liberación del cuerpo viral en el interior celular. Tras la desestructuración de la partícula vírica se libera el genoma y las proteínas virales en el citoplasma y se produce la retrotranscripción. Posteriormente, y formando parte de un complejo de integración, el ADN vírico viaja al núcleo y se integra en el genoma celular. En este estado de provirus la transcripción del genoma vírico da

lugar a ARNs diferentemente procesados que, o se incorporarán como genoma de las nuevas partículas virales o servirán como molde para la síntesis de las diferentes proteínas que forman la partícula vírica. Como eventos finales del ciclo, se produce una acumulación de los componentes del virus en zonas concretas de la membrana plasmática, y es en esas regiones donde ocurre la gemación y salida de la partícula viral (**Fig.1.4**) (23,24).

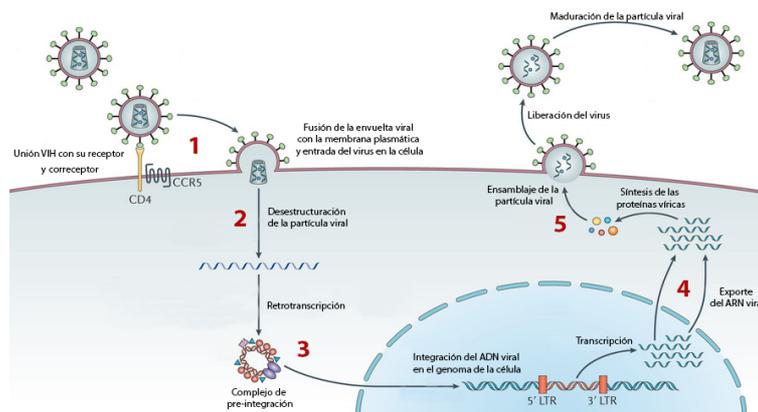


Figura 1.4: Ciclo viral del VIH en su célula diana.

Tras el primer contacto del virus con su receptor y co-receptor de la célula, se producen los cambios conformacionales que conducen a la presentación de la proteína viral gp41 que se ancla en la membrana celular, llevando a la formación del poro de fusión por reorganización del citoesqueleto celular y la fusión de ambas membranas (1). Tras la liberación de la cápside, ésta se desestructura liberándose el genoma y las proteínas que lo acompañan (2). En el citoplasma se inicia la retrotranscripción de las moléculas de ARN virales, y el ADN resultante viaja hasta el núcleo donde se integra en el genoma celular (3). El provirus integrado será transcrito y algunas de estas moléculas serán usadas como genoma vírico y otras sometidas a diferentes procesamientos darán lugar a las diferentes proteínas del virus (4). Finalmente, en la parte interna de la membrana plasmática se produce una acumulación de proteínas virales, en regiones específicas donde se encuentran presentadas hacia el exterior proteínas de la envuelta viral. Esta acumulación bajo la membrana evoluciona hacia una curvatura y gemación y por último, la liberación del virus (5).

Figura modificada de (339)

El genoma del VIH contiene una serie de genes comunes a todos los retrovirus como son los genes de proteínas estructurales, *gag* (que dará lugar a las proteínas Matriz, Cápside, Nucleocápside y p6) y *env* (codifica para las proteínas de

la envuelta del virus, gp120 y gp41), y genes de proteínas reguladoras: *tat* y *rev*. Además, el genoma viral codifica una serie de proteínas accesorias, en algunos casos exclusivos para del VIH-1, cuyos genes son *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* (Fig.1.5).

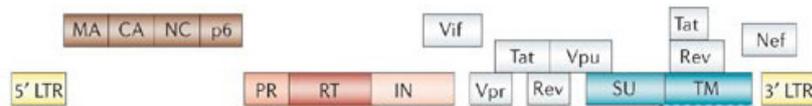


Figura 1.5: Genoma del VIH-1.

El genoma del VIH-1, de 9 Kb, consta de dos regiones LTR (Long Terminal Repeat) que lo flanquean, que actúan como promotores y participan en la recombinación con el genoma huésped para su integración. También presenta 3 genes comunes a todos los retrovirus que son *gag* (que dará lugar a las proteínas Matriz, Cápside, Nucleocápside y p6), *pol* (donde se codifican las enzimas Proteasa, Retrotranscriptasa, e Integrasa) y *env* (dará lugar a las dos proteínas de la envuelta viral gp120 y gp41). El genoma codifica para dos genes de proteínas reguladoras *Tat* y *Rev* y por último 4 genes que codifican para las proteínas *Vif*, *Vpr*, *Vpu* y *Nef*; *Vpr* única para el VIH-1

Figura modificada de (340)

### 1.1.3 Proteínas accesorias del VIH

Las proteínas accesorias del VIH carecen de actividad enzimática y no son imprescindibles para que el virus lleve a cabo un ciclo viral completo, pero poseen un rol esencial en la evasión del sistema inmune y en la patogenicidad del virus. Por ejemplo, cuando las proteínas de la envuelta del virus están siendo sintetizadas en la célula, a menudo quedan fijadas en el retículo endoplasmático por interacciones con moléculas de CD4 que están siendo sintetizadas de *novo*. La proteína *Vpu* promueve la degradación de estos CD4 evitando así esta interacción y permitiendo el transporte de las proteínas de la envuelta a la superficie celular (25-27). Otra función pro-viral de *Vpu* consiste en la modulación negativa de los niveles de la proteína BST-2 (Teterina o CD317), favoreciendo su desaparición de la membrana plasmática. BST-2 posee dominios transmembrana que pueden establecer un anclaje entre la membrana vírica y la celular que impida la liberación

completa del virus dejándolos anclados a la membrana celular (28–30). También se ha descrito que Nef logra disminuir la expresión de CD4 y MHC-I (*Major histocompatibility complex I*, complejo principal de histocompatibilidad I) en la superficie de la célula infectada, lo que afectaría tanto la unión de los viriones nacientes al CD4 de la célula productora y el reconocimiento de esta célula infectada por parte de los linfocitos T citotóxicos a través de MHC-I (31–35). Además, trabajos recientes han descrito el mecanismo por el que Nef también provoca la disminución de SERINC5 y SERINC3 en la membrana celular, alterando así la presencia de estas proteínas en la envuelta lipídica de los viriones nacientes y favoreciendo la infectividad de estos viriones, ya que estas dos proteínas transmembrana dificultarían la fusión de la membrana viral con la membrana celular en un nuevo evento de infección (36,37).

Muchos trabajos se han enfocado en dilucidar las funciones de las proteínas accesorias y, en síntesis, se ha visto que en la mayoría de los casos su principal actividad parece ser la evasión de mecanismos de resistencia antiviral presentes en la célula, contrarrestando la acción de los factores de restricción y de los mecanismos celulares antivirales (38,39).

## 1.2 Un paso más en la inmunidad innata: los factores de restricción.

Los factores de restricción son proteínas expresadas en células de mamífero que representan la primera línea de defensa contra una infección viral a nivel celular. Son consideradas parte de la inmunidad innata, ya que estas proteínas se expresan de manera constitutiva y presentan una actividad autónoma para evitar la replicación viral. Para ser aceptada una proteína celular como factor de restricción se ha consensuado que ha de cumplir una serie de premisas: 1) debe causar de manera directa y significativa un decremento en la infectividad del VIH, 2) debe existir un factor viral que contrarreste su acción, 3) el factor de restricción

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

debe presentar signos de rápida evolución y, por último, 4) la expresión de dicho factor ha de estar interconectada con la respuesta del sistema inmunitario, por ejemplo su expresión puede verse inducida como respuesta a interferón (38-40).

El primer factor de restricción descrito para retrovirus fue descubierto en 1967 cuando se describió que la proteína celular *Friend virus susceptibility 1* (Fv1) lograba inhibir la infección del virus de la leucemia murina (MLV, *Murine leukemia virus*) en ratones (41). Este primer descubrimiento fue seguido de multitud de investigaciones centradas en descubrir más factores de restricción y dilucidar el mecanismo por el cual los virus logran sobreponerse a su actividad. En relación al VIH son muchos los factores de restricción propuestos aunque sólo unos pocos han sido aceptados y correctamente caracterizados hasta la fecha (40,42,43). Los factores de restricción más estudiados incluyen proteínas con funciones dispares y que afectan a diferentes etapas del ciclo viral. Por ejemplo, la Teterina que explicamos anteriormente y que interfiere en la salida viral, o SAMHD 1, que en células dendríticas, macrófagos y monocitos depleciona los niveles de dNTPs intracelulares dificultando la etapa de retrotranscripción del virus (44-46). Otro ejemplo es la proteína TRIM5 $\alpha$  que impide, junto con la Ciclofilina A, la replicación del retrovirus uniéndose a la cápside viral e impidiendo la retrotranscripción, aunque curiosamente sólo presenta esta función la TRIM5 $\alpha$  de primates no humanos (47-49). De todos ellos, el factor de restricción contra VIH más conocido es APOBEC3G.

### 1.2.1 APOBEC3G y familia APOBEC

APOBEC3G (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G*, A3G), fue el primer factor de restricción anti-VIH identificado (50). Trabajos previos a su descubrimiento ya habían descrito dos tipos celulares distinguibles por su permisibilidad a ser infectadas o no, por un mutante del VIH que carecía de la

proteína accesoria Vif (51,52). Además, se comprobó en trabajos realizados en 1998 que el fenotipo permisivo era dominante frente al no permisivo, ya que, cuando se realizaban heterocariones mediante fusión de células de ambos fenotipos, estos heterocariones resultaban no permisivos a la infección por VIH- $\Delta$ Vif. Se postuló entonces la existencia de algún factor o componente en la célula no permisiva que dificultaba la infección del VIH y que presente en la célula no permisiva, al fusionarse esta célula con una célula permisiva, le transmitía este componente (52). No fue hasta el año 2002, cuando por análisis de las proteínas expresadas en células permisivas y en no permisivas se comprobó que existía una proteína, en principio denominada CEM15, que podría ser la responsable de este fenotipo (53). Por comparación de secuencias se vio la alta similitud que presentaba con una proteína ya descrita denominada APOBEC3G (54).

APOBEC3G (A3G) es una proteína de unos 46 KDa principalmente citoplasmática, aunque también se puede encontrar una pequeña fracción nuclear (55,56). Pertenece a una familia de proteínas altamente conservada de once miembros cuyos genes se encuentran localizados en diferentes cromosomas (57,58). Todos los miembros de esta familia tienen en común un dominio con actividad citidina desaminasa dependiente de zinc (ZDD) que cataliza la eliminación mediante hidrólisis del grupo amino de la citidina (C) para así formar una uridina (U) (54,59). La primera proteína descrita de esta familia fue APOBEC1 (60), cuyo gen se encuentra en el cromosoma 12. Estudiando la existencia de dos formas de la Apolipoproteína B (ApoB), una más pequeña que la otra, se vio que esa producción alternativa era debido a una modificación post-traducciona del ARN de la proteína. APOBEC1 provoca un cambio de C a U en el ARNm introduciendo un codón de stop prematuro en la secuencia (61). La proteína de tamaño inferior resultante de esta mutación es esencial para la absorción de grasas procedentes de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

la dieta en forma de quilomicrones (62). Trabajos posteriores demostraron, además, que APOBEC1 sobre-expresada en neuronas podía provocar deaminaciones en el genoma viral del *herpes simplex* (virus con genoma de ADN de cadena sencilla, ADNss) ejerciendo así un efecto negativo sobre el virus (63). Esta acción de protección frente a la infección por virus está altamente conservada en las proteínas de la sub-familia APOBEC3 (A3). A3G pertenece a esta sub-familia de siete proteínas cuyos genes se localizan en humanos en el cromosoma 22 (denominadas de la A a la H) (**Fig.1.6**) (54). Estas proteínas actúan principalmente como centinelas en la inmunidad innata contra retroelementos endógenos (LTR, LINEs y SINEs) y virus exógenos (64–68). La familia APOBEC3 sólo está presente en organismos placentarios, y tan solo en mamíferos encontramos la expresión de las siete proteínas (69,70). Es más, se ha visto que la expansión de las proteínas A3 en primates correlaciona positivamente con el decremento de retroelementos activos en humanos (68,69,71). En relación a su rol anti-retroviral, en cinco de los miembros de esta familia se ha descrito actividad anti-VIH: A3A (sólo en monocitos), A3DE, A3F, A3G y A3H (72–78).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

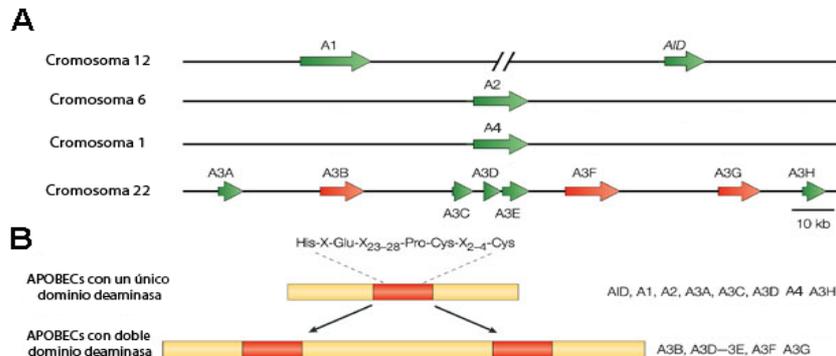


Figura 1.6: Familia de las proteínas APOBEC.

A) Se muestra la localización cromosómica de cada miembro de la familia. B) Se muestra una clasificación de la familia dependiente del dominio característico de todas ellas con actividad desaminasa.

Figuras modificadas de (338)

### 1.2.2 Función anti-retroviral de APOBEC3G

El mecanismo de acción de A3G se inicia cuando por uniones a la poliproteína estructural Gag-Pol (siendo esencial la región de la Nucleocápside, NC de Gag) éste es encapsidado dentro de la partícula viral (79,80). Se ha visto, además, que esta interacción está facilitada por la presencia de un ARN aunque su origen, viral o celular, aún se desconoce (79). Cuando el virus infecta a una nueva célula, y tras producirse la retrotranscripción, A3G actúa en la cadena *minus* del ADN viral mediante la desaminación de citidinas y provoca la aparición de uracilos en dicha cadena. De esta manera cuando se sintetiza la cadena de ADN complementaria, se generan multitud de sustituciones de base con guaninas (G) en lugar de adeninas (A) (Fig.1.7) (81-83). Esto desencadena los mecanismos de reparación de la célula involucrando la acción de las enzimas uracilo-ADN-glicosilasa que eliminan los uracilos de la cadena de ADN y posteriormente la activación de endonucleasas que detectan la ausencia de base nitrogenada en la

cadena y provocan el corte en la misma (84–86). El resultado de estos mecanismos reparadores es la generación de un menor número de copias de ADNc completo, existiendo un decremento de hasta siete veces en la producción de provirus integrados (87,88). Por otro lado, el ADN viral que escapa de esta degradación y es incorporado en el genoma celular presentará un gran número de mutaciones, principalmente codones stop, lo que conlleva a una producción de viriones defectivos que no serán capaces de completar el ciclo viral (**Fig.1.8**) (89).

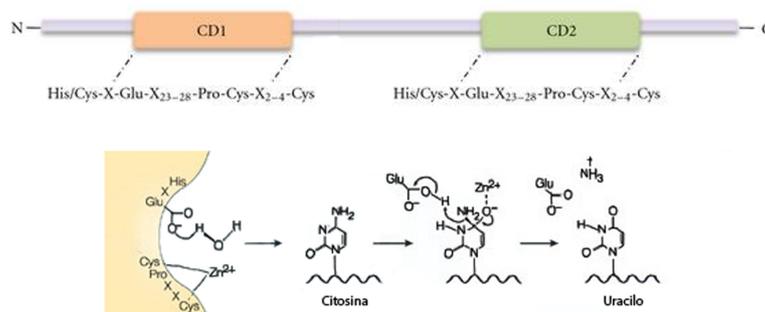


Figura 1.7: APOBEC3G

A) Esquema de la proteína de unos 46 KDa donde se indican los dos dominios desaminasa que requieren de  $Zn^{2+}$  para su actividad. B) Reacción de eliminación de un grupo amino de la base nitrogenada citidina catalizada por la proteína A3G. Esta reacción, mediante hidrólisis, lleva a la aparición de un uracilo en la cadena de ADN.

Figura modificada de (338,345)

Además de los trabajos de experimentación realizados *in vitro* e *in vivo*, que demuestran este efecto anti-retroviral, numerosas investigaciones clínicas han identificado cohortes de pacientes que presentan una elevada expresión de A3G y que correlacionan inversamente con la progresión a SIDA (90,91), o que siendo individuos altamente expuestos a la infección se mantienen seronegativos (92). Pero, igualmente, esta función anti-retroviral de A3G mediada por la hipermutación del genoma viral puede presentar un pequeño hándicap, ya que

algunos trabajos han revelado que en ocasiones puede provocar mutaciones favorables al virus y así beneficiar su efecto patogénico (93–95).

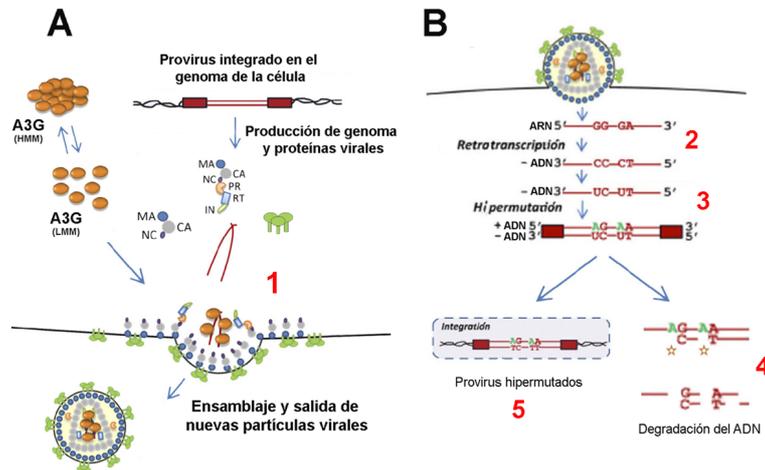


Figura 1.8: Mecanismo de acción de A3G.

A) Cuando a partir de una célula infectada se están liberando nuevos virus, A3G, gracias a interacciones con el genoma viral, es incorporado dentro de estas partículas (1). B) Cuando estos virus infectan una nueva célula, se produce la retrotranscripción del ARN viral (2), sobre esta cadena de ADN, la minus, A3G actúa provocando deaminaciones en las citidinas (3). La aparición de uracilos lleva a que, al sintetizarse la cadena complementaria, hayan mutaciones de G a A. Cuando el ADN viral mutado entra en el núcleo para integrarse en el genoma celular, la maquinaria de reparación de la célula detecta la presencia de U en la cadena de ADN y provoca su degradación (4). Por otra parte, el genoma viral que resulta integrado y escapa de la degradación, presenta un número tan elevado de mutaciones que no es capaz de producir viriones infectivos (5).

Dentro de la actividad protectora de A3G frente a la infección por el virus, diversos trabajos han visto que esta actividad puede ser dissociada de su acción citidina deaminasa: mutantes de A3G cuyos dominios de acción han sido inactivados siguen presentando cierta actividad anti-VIH (96,97), además de impedir el proceso de integración del ADN viral en el genoma celular (98) o bloquear la retrotranscripción uniéndose al ARNt necesario para iniciarla (99). Además, los efectos anti-retrovirales de A3G no están sólo limitados contra el VIH,

se extiende a otros retrovirus incluyendo MLV (*Murine Leukemia Virus*), SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*) y EIAV (*Equine Infectious Anemia Virus*) (100–102).

Como hemos explicado al inicio de este apartado, la acción de A3G sobre la replicación viral sólo se observa en determinados tipos celulares, denominados no permisivos (células T primarias, macrófagos y algunas líneas celulares CD4<sup>+</sup>) y siempre y cuando el virus que infecta carezca de la proteína accesoria Vif.

### 1.3 El factor de infectividad viral, Vif.

Vif (*Viral Infectivity Factor*), una de las seis proteínas accesorias del VIH, es esencial para la replicación viral y la patogénesis del virus, es de pequeño tamaño (23 KDa) y participa en las etapas finales del ciclo viral (103–107). Esta proteína está presente en todos los lentivirus excepto en EIAV, esta ubicuidad nos indica la importancia de su función en la replicación viral (108,109). En los primeros estudios sobre el VIH tras describirse su ORF (*open reading frame*, marco de lectura abierto), este gen fue denominado como gen *src* (110,111), pero estudios posteriores del producto de este gen demostraron la necesidad de su presencia para la producción de virus infecciosos en líneas celulares T CD4<sup>+</sup>, lo que hizo que pasase a conocerse como factor de infectividad viral, Vif (105,112,113).

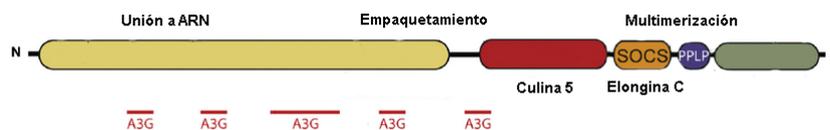


Figura 1.9: Estructura de la proteína Vif.  
Se indican los dominios de interacción con A3G, las regiones implicadas en la nucleación del complejo de ubiquitinación y las regiones implicadas en el empaquetamiento de las proteínas en los nuevos virus  
Figura modificada de (258).

### 1.3.1 Papel de Vif en el ciclo viral.

La principal función de Vif conocida hasta la fecha es la de contrarrestar la función de A3G evitando su encapsidación dentro de la partícula viral, acción que lleva a cabo provocando la degradación de este factor de restricción. Vif en el citoplasma celular, recluta proteínas celulares tales como Culina 5-Rbx, Elongina B y C, y CBF- $\beta$ , formando así un complejo ubiquina-ligasa de tipo E3 donde Vif actúa como la subunidad de reconocimiento de sustrato (114,115). De esta manera Vif reconoce a A3G y promueve su poli-ubiquitinación, provocando su degradación por el proteasoma celular (116–118). Durante este proceso Vif también resulta ubiquitinado, pero esta ubiquitinación no provoca la degradación de la proteína viral (117,119). De esta manera el *pool* intracelular de A3G se ve dramáticamente disminuido impidiendo así que pueda ser encapsidado en los viriones nacientes (**Fig.1.10**). Este mecanismo de Vif también actúa sobre el resto de proteínas de la familia A3 con actividad anti-retroviral, como son A3F, A3D y A3H (120–123).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

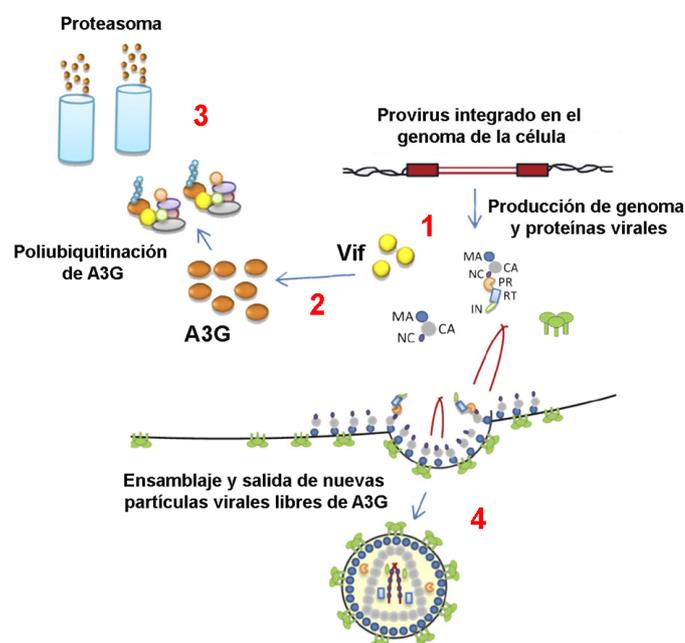


Figura 1.10: Mecanismo de acción de Vif y estructura de la proteína. En células no permisivas, que expresan A3G, la proteína accesoria del virus Vif (1), agrupa un complejo de ubiquitinación, donde actúa dando especificidad de sustrato (2). Así reconoce a A3G y promueve su poli-ubiquitinación. Finalmente, A3G es reconocido por la maquinaria de degradación de la célula debido a esta cola de ubiquitinas y es degradado por el proteasoma (3). Los nuevos virus serán liberados libres de A3G y podrán continuar su ciclo de infección (4).

Figura modificada de (258)

Otra acción descrita para Vif ha sido la afinidad que éste presenta a secuencias específicas del ARNm de A3G, en concreto una región en el 5' UTR (124,125). Tras la unión al ARNm de A3G, Vif podría impedir la traducción de la proteína o provocar la degradación del ARNm llevándolo a cuerpos intracelulares de procesamiento (*P-bodies*, estructuras celulares relacionadas con el control y degradación de ARNm (126)), ya que se ha descrito que Vif provoca una reducción de los niveles de ARNm de A3G de entre un 15-40 % (124,125,127). En ambos casos Vif lograría impedir la síntesis de nuevas proteínas A3G (Fig.1.11).

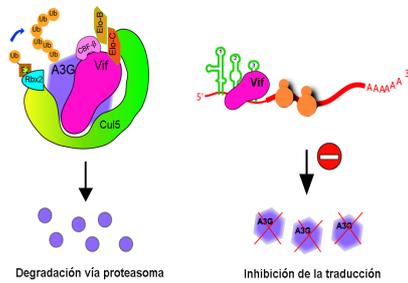


Figura 1.11: Mecanismos principales de inhibición de A3G por parte de Vif.

Vif puede impedir la traducción de nuevas proteínas A3G por uniones a su ARNm.

Figura modificada de (343)

A pesar de que este es el mecanismo de Vif mejor estudiado, diversos trabajos han revelado que la producción de virus infecciosos y la degradación de A3G podrían ser eventos funcionalmente separables. Vif logra prevenir la encapsidación y contrarrestar la actividad antiviral de un mutante de A3G (A3G C97A) que resulta resistente a la degradación (128), por lo que se piensa que la degradación de A3G dependiente de Vif y la inhibición de su encapsidación podrían seguir rutas independientes o existir algún mecanismo adicional que evite la encapsidación de A3G. De manera constitutiva, A3G forma parte de complejos de alto peso molecular, requiriendo su disociación y formación de complejos de bajo peso molecular para permitir su encapsidación dentro del virión (129-131). Vif podría inducir la formación de estos complejos de alto peso molecular quedando A3G “atrapado” y evitando su encapsidación por una vía independiente a la degradación proteasómica (132).

Con respecto a la localización intracelular de Vif, se ha caracterizado como una proteína citoplasmática, estando presente en la célula durante la infección y después del exporte nuclear del ARNm del virus, en cantidades abundantes. Llegando a cantidades semejantes a la mitad de la cantidad de la proteína estructural Pr55-Gag (133,134). Curiosamente, Vif presenta dos dominios putativos

de localización nuclear en las regiones tanto N como C terminal, por lo que algunos estudios le proponen cierta regulación de localización nuclear, pero además, cuenta en su secuencia con una señal inhibitoria de transporte nuclear (135). La importancia de su ubicación citoplasmática es consistente con los datos de un estudio clínico que caracterizaba un aislado de VIH cuyo Vif presentaba una mutación que provocaba la aparición de un motivo de localización nuclear, anclando a esta proteína en el núcleo, en un paciente asintomático de larga duración (136).

Estudios sobre todas las posibles funciones de Vif han descrito que los virus que carecen de esta proteína (virus  $\Delta$ Vif), presentan una morfología aberrante y poca estabilidad de la partícula viral, lo que hace suponer un posible papel de Vif en el ensamblaje del virión (105,106,137-139). Estos defectos observados consisten en un heterogéneo empaquetamiento del core con formaciones concentradas de material electrodens, aunque por otra parte, diversos estudios han demostrado que Vif no afecta o interviene en el contenido proteico o de ARN de la partícula viral (134,140). Vif interacciona con dos dominios de Pr55-Gag, gracias a 22 aminoácidos de la región C terminal que se unen a las regiones NCp7 (Nucleocápside-p7) y una región intermedia entre MA (Matriz) y CA (Cápside) (141,142). Actualmente, la importancia de esta interacción no está definida, pero se cree que puede ayudar a la localización citoplasmática de Vif o a su encapsidación dentro del virión naciente (143,144). La interacción Pr55-Gag/Vif se evidenció en experimentos donde la infectividad de viriones  $\Delta$ Vif fue rescatada por un aporte *in trans* de la proteína de manera dosis dependiente, pero esta respuesta alcanzó un umbral a partir del cual el efecto se revertía, es decir, mayores cantidades de Vif provocaban una pérdida de la infectividad. Se vio que una presencia excesiva de Vif llevaba a la acumulación de intermediarios del

procesamiento de Pr55-Gag debido a las interacciones entre ambas proteínas lo que impedía el ensamblaje y maduración de las partículas virales (145,146).

Uno de los mecanismos que llevan a la gran depleción de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que sufren los infectados por el VIH es debido a la muerte de estas células por el bloqueo que provoca el virus en la fase G2 del ciclo celular (147). Un estudio para analizar cómo el VIH provoca este bloqueo consistió en la eliminación secuencial de las proteínas accesorias del virus hasta observar la pérdida de este fenómeno. La eliminación de los genes accesorios *vif* y *vpr* provocaban que el virus resultante fuese incapaz de causar muerte celular y el arresto en G2, haciendo responsable del fenómeno a la acción de estas dos proteínas virales. Pero, incluso recuperando tan solo la expresión en solitario de Vif, ya se conseguía inducir una acumulación de células en fase G2 (148-151), aunque el mecanismo por el cual Vif lleva a cabo este efecto sobre la célula aún no está descrito. Por lo tanto, la expresión de Vif también se relaciona con un efecto citopatogénico viéndose muy implicada en la patogénesis del virus (152-154).

Todas las funciones descritas hasta la fecha de la proteína accesoria Vif y los procesos donde parece estar implicada, revelan la importancia de esta pequeña proteína para la supervivencia del virus y el papel que tiene en la patogénesis de la infección y por tanto el desarrollo de la enfermedad. Por ello, Vif se convierte en un foco importante de interés en el estudio de este virus como posible diana terapéutica para lograr el control de la infección.

#### 1.4 Pr55-Gag, origen de la estructura del virus.

Otra proteína viral objeto de estudio en este trabajo es la proteína estructural Pr55-Gag (Gag), común a todos los retrovirus. Esta poliproteína de 55 KDa es el resultado del procesamiento de un péptido mayor de 160 KDa que

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

comprende las proteínas del virus Gag y Pol. Gag dirige el ensamblaje de la partícula viral, e incluso en ausencia del resto de componentes virales es capaz de originar VLPs (virus-like particles, partículas similares a virus) (155–157). Gag será finalmente procesada por la Proteinasa viral (PR) dando lugar a las proteínas Matriz (MA), Cápside (CA) y Nucleocápside (NC), y en el caso del VIH, también aparecen la proteína p6 (correspondiente a la región más C terminal de Gag) y los péptidos espaciadores SP1 y SP2 (situados entre CA y NC y entre NC y p6 respectivamente) (Fig.1.12) (158,159).

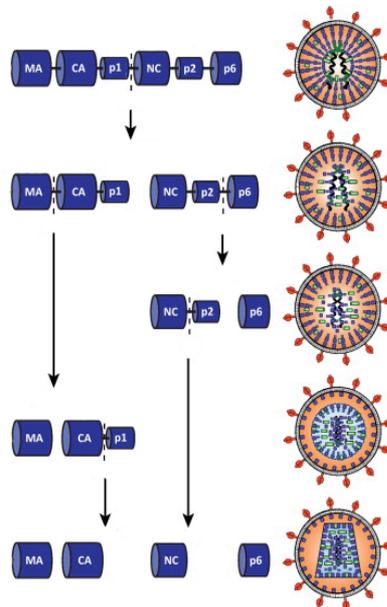


Figura 1.12: Representación de la proteína Pr55-Gag y su procesamiento.

Gag, puede provenir de una poliproteína mayor de 160KDa (conjunto de Gag y Pol, en el 5% de los casos), que una vez escindida continua su procesamiento para dar lugar a las proteínas Matriz, Cápside, Nucleocápside y p6.

Figura modificada de (159)

#### 1.4.1 Ensamblaje del virión a partir de Pr55-Gag

El ensamblaje del virus dentro de la célula puede ser dividido en diferentes etapas. En primer lugar, y tras la miristoilación de la región de la proteína Matriz, Gag queda anclada en regiones específicas de la membrana plasmática. Estas

regiones presentan una composición lipídica determinada y una acumulación de proteínas de la envuelta viral presentadas hacia el exterior celular (160,161). Posteriormente, debido al anclaje de gran número de estas proteínas Gag en estas regiones, comienza a generarse una pequeña gemación hacia el exterior por inducción de la curvatura de la membrana. Finalmente, la liberación de la nueva partícula se produce con el cierre de la envoltura alrededor del cuerpo viral y la fisión de la membrana celular. Es durante este proceso o en eventos posteriores (aún existe controversia al respecto), cuando la Proteasa viral presente dentro del virión realiza un procesamiento de Gag dando lugar a las proteínas ya mencionadas (Fig.1.13) (159,162,163).

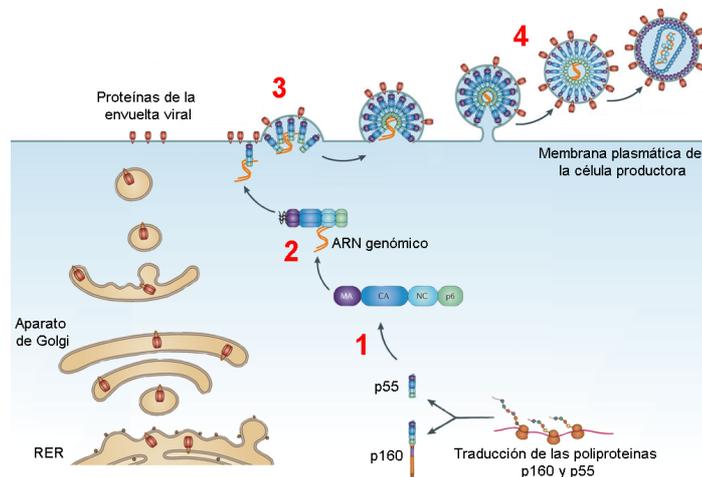


Figura 1.13: Ensamblaje del virión.

Tras la traducción de la proteína Gag (de 55 KDa o en conjunto con Pol de 160 KDa) (1), ésta reconoce al genoma viral y tras sufrir la miristoilación de la región MA (2) se ancla a la membrana plasmática en regiones con alta concentración de colesterol y donde se encuentran expuestas al exterior proteínas de la envuelta viral (3). En esas zonas, tras la agrupación de varias proteínas Gag, comienza a formarse una curvatura de la membrana envolviendo los componentes víricos. Finalmente se produce la escisión del virus, se activa la Proteasa viral y con ella se produce la maduración de la partícula (4).

Figura modificada de (346,347)

Para llevar a cabo este proceso, Gag hace uso de la maquinaria celular, requiriendo la participación de varios componentes celulares. Específicamente, Gag utiliza el mecanismo de una compleja red de proteínas encargadas del transporte extracelular de proteínas ubiquitinadas. Este complejo denominado ESCRT I (*Endosomal complex required for transport I*, complejo endosomal requerido para el transporte I) conforma un entramado de proteínas y factores accesorios cuya función principal consiste en el reconocimiento y agrupación de proteínas ubiquitinadas, formando MVB (*Molecular Vesicular Bodies*, cuerpos multivesiculares) o endosomas, y transportarlas a la membrana plasmática y expulsarlas al exterior. Gag, mediante su motivo P(T/S)AP recluta el complejo celular ESCRT-I (a través de interacciones con uno de sus componentes TSG101 (164-166) y a otros factores implicados en este proceso, como es AIP1 a través de su motivo YPXL/LXXLF (166,167). Así, beneficiándose de este mecanismo celular de transporte, Gag es posicionada en la membrana plasmática y lleva a cabo el proceso de *budding* viral (168-170).

#### 1.4.2 Papel de la Ubiquitina en el ensamblaje y maduración del virión

Existen muchas evidencias que sugieren que la proteína celular Ubiquitina (Ub) es importante en el proceso de ensamblaje viral en retrovirus, y se ha demostrado que dentro de la partícula viral puede llegar a encapsidarse Ub libre en niveles superiores al 10 % de proteína Gag. Además de la presencia de Ub libre, está aceptada la mono- o di-ubiquitinación de hasta un 5 % de las proteínas Gag en su región p6 (171,172). Este hecho está explicado, en parte, por el requisito del complejo de transporte ESCRT I que actúa principalmente sobre proteínas ubiquitinadas (173,174). En experimentos in vitro se ha visto que la afinidad de interacción entre la región p6 de Gag y TSG101 se ve fomentada cuando p6 es expresada con Ub fusionada en su región C terminal (172), lo que apoyaría la idea

de la importancia de la ubiquitinación de la proteína viral para la adecuada interacción con las proteínas celulares que ayuden al virus a una salida exitosa de la célula. Algunos estudios, además, han demostrado que las proteínas Gag unidas a membrana presentaban niveles de mono-ubiquitinación mucho más altos que las proteínas Gag presentes en la fase soluble, postulándose que la ubiquitinación fomentaría la unión a membrana (175). También se ha visto que la inhibición del proteasoma, que provoca una alteración de la dinámica de la proteína Ubiquitina en la célula bloquea la liberación de VIH y otros retrovirus (176–178).

Aunque la ubiquitinación de Gag está firmemente aceptada, se desconoce: la maquinaria celular que lleva a cabo este evento, los factores reguladores que evitan que este marcaje sea pro-degradativo, la localización intracelular y momento temporal donde esta modificación post-traducciona es llevada a cabo o qué regiones de Gag resultan ser las dianas indispensables. Aunque algunos estudios han revelado que la ubiquitinación de Gag sólo se produce en su región C terminal, en concreto en la región p6 (179,180), estudios posteriores detectaron que las dianas de ubiquitinación van más allá de esta región p6 (175). En experimentos con provirus cuyas regiones de Gag fueron mutadas mediante cambio de aminoácido (las lisinas fueron sustituidas por argininas), de manera individual o combinada, se estudió la liberación y maduración de virus. Se vio que las regiones mutadas y por tanto no ubiquitinables eran compensadas por la ubiquitinación de otras regiones con sus lisinas intactas. Finalmente, se producía un defecto importante en la salida y maduración viral, quedándose las partículas inmaduras ancladas en la membrana celular, cuando todas las regiones de Gag fueron insensibles a la ubiquitinación. Por lo tanto, parece ser que no existe una lisina o región única indispensable para este proceso, pero las mutaciones en la región C terminal (NC, SP2 y p6) en su conjunto eran las que provocaban el

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

fenotipo más defectivo (175,181,182). Sorprendentemente, las mutaciones en las regiones NC o SP2 llevaban a un incremento en la ubiquitinación de Gag en los lisados celulares, algo que no se correspondía en los productos derivados de Gag en los viriones maduros (181). Es posible que, tras cumplir su función de señal, Gag sufra una de-ubiquitinación durante o después de la liberación del virus o que exista algún mecanismo de exclusión de los viriones de proteínas Gag hiperubiquitinadas. Todos estos datos indican que los procesos de multimerización de Gag, su asociación a membrana y su ubiquitinación son eventos íntimamente ligados, habiendo una correlación positiva muy clara entre la proporción de proteínas Gag modificadas con Ubiquitina y la cantidad de Gag que logra multimerizar y anclarse a la membrana. Por ello, esta modificación post-traduccional puede convertirse en un foco importante de interés, no sólo para su estudio y entendimiento, sino también como diana sobre la cual interferir y afectar al éxito del ciclo viral (178).

En este doble escenario que hemos presentado, compuesto por factores de restricción que son degradados por una proteína accesoria del virus, Vif mediante la poli-ubiquitinación, y por Pr55-Gag, una proteína estructural que requiere de ubiquitinaciones para llevar a cabo su función, focalizamos nuestra atención sobre una proteína celular llamada HDAC6. Aunque estudios previos ya le habían otorgado a HDAC6 cierta función anti-VIH al impedir la entrada viral en la célula por afectar a la formación del poro de fusión (183), este trabajo busca ampliar la caracterización anti-VIH de HDAC6 centrándonos en su capacidad para reconocer y unir Ubiquitina y el papel que juega en las diferentes vías degradativas celulares. HDAC6 es un componente esencial en el transporte retrógrado de cargos celulares, en la autofagia, y en respuesta frente a situaciones de estrés celular como puede ser la infección de un virus.

## 1.5 Una Histona Desacetilasa diferente: HDAC6

### 1.5.1 Familia de las Histonas Desacetilasa

El estudio de cómo la célula regula la expresión de sus genes en base a factores cambiantes, tales como el ambiente o las diferentes fases del ciclo celular, llevó al descubrimiento de que modificaciones postraduccionales de las histonas producen un remodelamiento de la cromatina (184). Este remodelamiento modificaba la accesibilidad del ADN a ser transcrito, facilitando o evitando la expresión génica (185). Una de las modificaciones más comunes es la acetilación o desacetilación, llevada a cabo por proteínas denominadas **Histonas Acetiladas** (HATs) y por **Histonas Desacetiladas** (HDACs), respectivamente. Actualmente, se sabe que la regulación de la expresión génica es muy compleja y que incluye muchos más factores, condicionantes y vías de las que se pensaba en un principio (186,187), pero el descubrimiento de estas modificaciones de las histonas abrió el camino para la descripción de una gran familia de proteínas, las HDACs, con multitud de funciones dentro de la célula, no sólo como participantes en la regulación de la expresión génica (188,189). Actualmente están descritas dieciocho HDACs que se clasifican en cuatro grupos según la homología de sus secuencias y su cofactor (190). Los miembros de las clases I, II y IV son dependientes de  $Zn^{2+}$  en su actividad enzimática, mientras que los miembros de clase III (conocidos como Sirtuinas) requieren a  $NAD^+$  como cofactor (**Fig.1.14**) (190–192).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

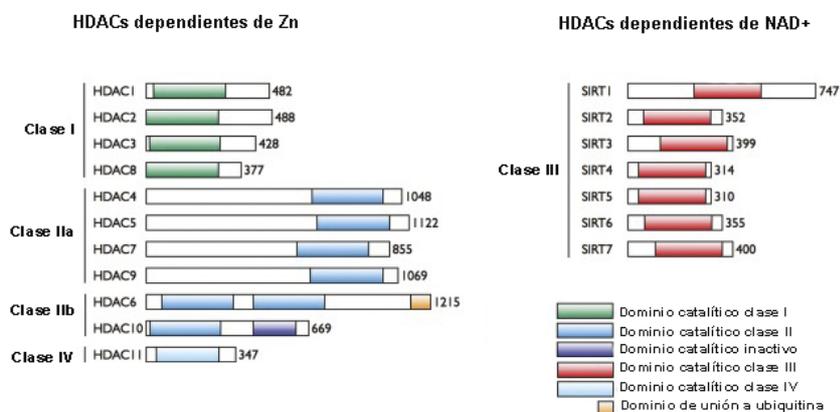


Figura 1.14: Esquema de la familia HDAC. Se clasifican según en el cofactor necesario para su actividad en dos grandes grupos y posteriormente según el tipo de dominio catalítico que posean en 4 clases en total.

Figura modificada de (344)

La mayoría de estas proteínas poseen dominios de localización nuclear (NLS, *nuclear localization signal*) ya que su principal función la llevan a cabo en el núcleo de la célula, pero muchos miembros de esta familia poseen además una señal de exporte nuclear (NES, *nuclear export signal*), lo que les permite una localización dinámica entre el citoplasma y el núcleo, participando en más procesos ajenos a la remodelación de la cromatina y con sustratos diferentes a las histonas (191).

HDAC6 pertenece a la Clase IIb y presenta una serie de características únicas. El gen de HDAC6 fue descubierto en 1999 mediante análisis comparativo de secuencia en bases de datos entre las secuencias de HDAC de levaduras con ORFs de genomas de ratones. Así se detectó la secuencia de un gen que codificaba para una proteína con dos dominios putativos de actividad desacetilasa, llamada en un principio mHDA2 (193). Durante ese mismo año, se produjo el descubrimiento de hasta 6 HDACs diferentes y se establecieron las primeras clasificaciones,

denominándose según el orden de caracterización, por lo que fue denominada HDAC6 (194).

### 1.5.2 Características de HDAC6 y su función en la célula.

HDAC6 es el único miembro de esta gran familia que posee dos dominios funcionales de desacetilación, y también cuenta con NLS y NES, lo que le otorgaría una localización dual, pero la presencia de una secuencia específica llamada SE14 (única en la proteína humana) supone una señal de retención citoplasmática, por lo que una vez traslocada del núcleo al citoplasma, HDAC6 queda anclada en este compartimento celular (195–197). También es el único miembro de esta gran familia que posee un dominio de unión a Ubiquitina (198). Este dominio situado en el extremo C terminal de la proteína presenta una conformación en dedos de zinc y posee una gran capacidad de unión a Ubiquitina. Esta región, conocida habitualmente como BUZ (**B**ound to **u**biquitin **z**inc **f**inger) también puede denominarse DAUP (**d**eacetylase-**u**biquitin-**s**pecific **p**rotease), HUB (**H**DAC6-**U**SP3-**B**RAP2-related), PAZ (**p**olyubiquitin-**a**ssoiated **z**inc **f**inger) y ZnF-UBP (**U**biquitin **C**-terminal **h**ydrolase-like **z**inc **f**inger) (Fig.1.15) (198–201).



Figura 1.15: Esquema de la proteína HDAC6.

Se muestra los dominios principales de la proteína, sus dos dominios catalíticos activos (azul), su región BUZ de unión a ubiquitina (verde), la región putativa de localización nuclear, NLS (rosa) y las regiones responsables de su ubicación en el citoplasma que son dos regiones de exporte nuclear, NES y el tetrapéptido SE14 (amarillo).

Figura modificada de (349)

Diversas investigaciones han revelado que HDAC6 está implicada en multitud de procesos celulares y son varios los sustratos sobre los que actúa (202–207). La función principal que se le ha otorgado es la de actuar como elemento

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

fundamental en la respuesta a la acumulación de proteínas no funcionales y la participación activa en el proceso de autofagia para la degradación de estos agregados.

El mecanismo habitual de degradación o reciclaje de proteínas que, o bien ya no son necesarias para la célula, o presentan una conformación errónea para su función, pasa por su poli-ubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma (208). Este sistema puede verse sobrepasado ante la acumulación excesiva de proteínas poli-ubiquitinadas, o sufrir algún tipo de bloqueo, o simplemente la tendencia que presentan algunas proteínas ubiquitinadas a agregarse las hace menos accesibles al proteasoma por lo que acaban acumulándose en el citoplasma celular. La acumulación de proteínas mal plegadas y ubiquitinadas con tendencia a formar agregados en el citoplasma, supone un elemento de toxicidad para la célula que puede llegar a poner en riesgo su viabilidad y supervivencia (209). Por ello una eficiente eliminación de estas proteínas y agregados es clave para la supervivencia celular. Para evitar esta toxicidad, estos agregados son secuestrados en cuerpos de inclusión pericentriolares denominados agresomas, que son finalmente procesados (210). Esto se realiza mediante un transporte retrógrado de los agregados mediante los motores de Dineína usando la red de microtúbulos de la célula como guía. HDAC6 cumple varias funciones en este proceso, en primer lugar, mediante la desacetilación de las sub-unidades  $\alpha$  de Tubulina (211) adecua la dinámica del citoesqueleto celular para el transporte (212-214), por otro lado, gracias a su dominio BUZ reconoce las ubiquitinas de estos agregados, y por interacciones con Dineína actúa como el nexo entre estos agregados y el complejo que los transporta para formar los agresomas (204,215,216). Finalmente, durante el proceso de degradación, que se realiza vía autofagia, HDAC6 actúa sobre la Cortactina favoreciendo el remodelamiento de F-Actina importante para la fusión de autofagosomas con los lisosomas (**Fig.1.16**) (217,218).

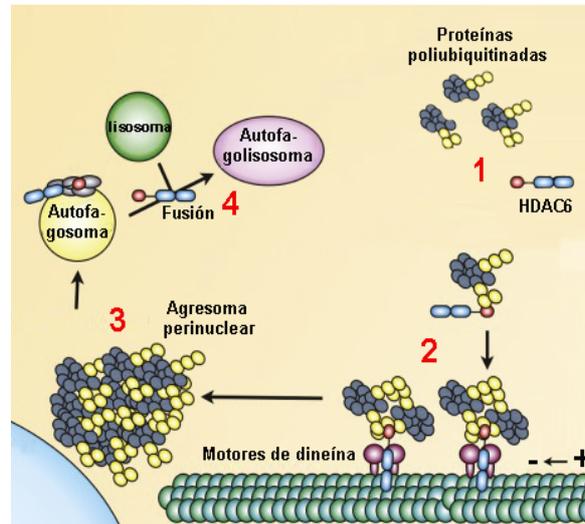


Figura 1.16: Función de HDAC6 en la formación de agresomas.

HDAC6, gracias a su dominio Buz, reconoce las Ubiquitinas de las proteínas mal plegadas y/o agregadas que se encuentran en el citoplasma (1). Actúa como unión entre estos agregados y la maquinaria de transporte dineína, que los dirige en sentido retrógrado hacia el MTOC (2). Ahí se produce una acumulación de estos agregados formándose una estructuras denominadas agresomas (3). Finalmente, en eventos donde HDAC6 también interviene, estos agregados son englobados en autofagosomas que tras la fusión con lisosomas tendrá lugar su procesamiento por la maquinaria autofágica (4).

Figura modificada de (344)

### 1.5.3 Autofagia y participación de HDAC6 en el proceso.

La autofagia es un proceso altamente complejo y conservado en las células eucariotas, descrito por primera vez en 1962 (219). El término proviene del griego y significa “comerse a uno mismo”, ya que los primeros estudios revelaron que este proceso se desencadenaba en estados de privación de nutrientes, donde las células comenzaban un proceso de degradación de orgánulos y proteínas propias obteniendo así una fuente de nutrientes. Este proceso supone una solución a corto plazo ya que si es mantenido en el tiempo finalmente las células entran en apoptosis y mueren (220-222). Actualmente se sabe que la autofagia no sólo

interviene en estos casos si no que actúa en multitud de procesos celulares, existiendo muchos actores que participan en el proceso y diferentes vías de activación. Por ejemplo, en la autofagia inducida por privación de nutrientes, donde el propósito es la degradación de constituyentes citosólicos para mantener las funciones celulares esenciales, la captura autofágica de agregados se produce de manera aleatoria en el citoplasma siendo este un proceso ineficiente para la degradación de elementos concretos. En cambio, la autofagia puede ser inducida mediante señales específicas, llevándose a cabo la degradación de elementos concretos respetándose la integridad del resto de los componentes celulares, como ocurre en el caso del procesamiento de los agregados (223-226).

La autofagia, en síntesis, consiste en la nucleación de los componentes destinados a degradación en vesículas denominadas autofagosomas, donde la doble membrana que compone el autofagosoma proviene principalmente del Retículo Endoplasmático o del Aparato de Golgi (227,228). Estos autofagosomas se fusionan con lisosomas donde las enzimas y proteasas del interior lisosomal procesarán dichos componentes (229,230). Previa a la fusión con el lisosoma los autofagosomas pueden pasar por una etapa intermedia de anfisoma, vesícula resultante de la fusión de un endosoma con autofagosomas (231). Durante la autofagia puede realizarse el procesamiento no sólo de proteínas para su reciclaje, como hemos explicado, sino también de orgánulos celulares, habitualmente mitocondrias y ribosomas, agregados proteicos citotóxicos, patógenos, componentes extracelulares internalizados en endosomas, etc (Fig.1.15) . (232-236).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

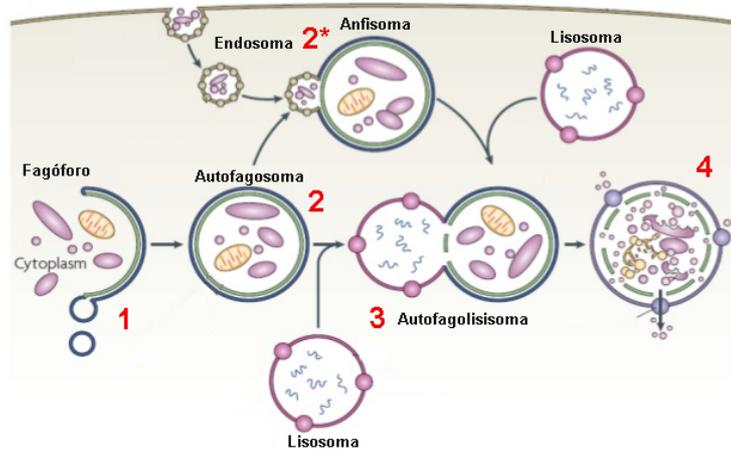


Figura 1.17: Esquema del proceso de la autofagia.

En regiones del citoplasma comienza la nucleación de una vesícula denominada fagóforo (1). Una vez completada la formación de la vesícula de doble membrana con origen del Aparato de Golgi y del Retículo Endoplasmático, nos encontramos frente a un autofagosoma que engloba todas las proteínas, componentes celulares o patógenos que deberán ser degradados (2). El autofagosoma se fusionará con un lisosoma formándose un autofagolisosoma (3). Aunque previo a este evento, el autofagosoma puede fusionarse con un endosoma con material proveniente del exterior celular, encontrándonos un estado intermedio en el proceso por la formación de anfisomas (2\*). Finalmente, los autofagolisosomas o anfilisomas, pierden la membrana interna de la vesícula y comienza el procesamiento del interior y la actuación de la proteasas del lisosoma (4).

Figura modificada de (341)

Este proceso implica una gran dinámica de membranas dentro de la célula, por lo que muchos patógenos hacen uso de ella para completar su ciclo vital (237,238). Algunos virus promueven la maquinaria autofágica y por tanto se benefician de la dinámica de membrana y vesículas que conlleva, y así favorecen la salida o entrada de las partículas, o incluso el transporte dentro de la célula (239–244). Pero debido a que este proceso también puede ser un mecanismo de degradación de patógenos, y por tanto de protección frente a infecciones, se han descrito casos de virus que provocan el bloqueo de la autofagia para escapar de la maquinaria de degradación. Es decir, ciertos virus pueden modular este proceso,

promoviendo su activación o inhibiéndolo en función de la fase del ciclo viral en la que se encuentren.

El papel de HDAC6 en el proceso de la autofagia es muy complejo. Como hemos contado, reconoce los agregados poli-ubiquitinados, condiciona la red de microtúbulos y facilita la remodelación de la Actina necesaria para la fusión con los lisosomas, pero también se ha demostrado que participa en los procesos de mitofagia (autofagia donde se procesan las mitocondrias) (217), e interviene en las etapas de regulación de la autofagia desacetilando e interaccionando con moléculas clave del proceso (como son p62 y LC3) (245-247). Además del papel que HDAC6 desempeña en estos procesos relacionados con la degradación y la autofagia, varios trabajos han descrito su importancia en los eventos de quimiotaxis y la movilidad celular debido a su papel modulador del citoesqueleto celular (248-251). Con respecto a una posible actividad de HDAC6 de protección frente a infecciones, varios trabajos han descrito que la sobre-expresión de HDAC6 y la consecuente afectación del citoesqueleto celular logra reducir la infección viral del VIH por impedir la formación del poro de fusión, además de afectar a la infección por otros virus (183,252,253). Pero además, HDAC6 también podría influir en otros momentos del ciclo viral ya que se ha visto que impide la correcta transcripción del VIH desacetilando una lisina clave de la proteína viral Tat, proteína reguladora del virus que potencia la elongación de la transcripción (254).

Debido a los indicios de un posible papel anti-viral de HDAC6, a su gran capacidad de unión a proteínas ubiquitinadas y el nexo que supone entre las vías proteasómicas y autofágicas de degradación, habitualmente usadas y manipuladas por el VIH, decidimos estudiar la posible actividad anti-retroviral de HDAC6 en este contexto.

# 2

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

El objetivo de esta tesis doctoral se centra en el estudio de una posible función anti-retroviral de la proteína celular HDAC6, ya que consideramos que las características especiales que posee esta proteína la convierten en un candidato idóneo para su estudio. Otros trabajos han descrito acciones anti-VIH de HDAC6 en los que su actividad desacetilasa, que afecta a la estabilización del citoesqueleto, dificulta la entrada viral. Nosotros nos queremos centrar en su capacidad de unión a la proteína Ubiquitina y el papel que tiene en el proceso degradativo de la autofagia. Nuestras hipótesis se enfocan en el efecto anti-viral de HDAC6 en dos procesos importantes del ciclo de vida del VIH-1 y donde la ubiquitinación aparece como señal post-traducciona crucial.

Hipótesis 1:

Proponemos que HDAC6 reconoce las señales de ubiquitinación de A3G y Vif actuando, por una parte, como protector de A3G secuestrándolo y evitando que sea degradado por el proteasoma y por otra parte, capturando a Vif destinándolo a la degradación vía autofagia. Al provocar la disminución de la presencia de Vif en la célula, la encapsidación de A3G no se encontrará limitada y éste podrá ejercer su función de factor de restricción. De esta manera HDAC6 se convertiría en un factor de protección para A3G.

Hipótesis 2:

Proponemos que HDAC6 reconoce las agrupaciones de Gag ubiquitinadas que se producen durante el proceso normal de salida y maduración del virus y los deriva para una degradación autofágica. Afectando por tanto a una proteína estructural del virus y dificultando seriamente la producción vírica.

Para abordar nuestras hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

### 1. Estudio del papel de HDAC6 sobre el complejo A3G/Vif.

- 1.1 Estudiar el efecto de HDAC6 sobre la degradación y poli-ubiquitinación de A3G promovida por Vif, analizando si estas 3 proteínas interactúan entre sí y si HDAC6 en ausencia de A3G, logra desestabilizar a la proteína viral Vif.
- 1.2 Estudiar si la degradación de Vif inducida por HDAC6 sigue la ruta autofágica y qué dominios descritos de HDAC6 son relevantes para esta acción.
- 1.3 Analizar el efecto de HDAC6 sobre la incorporación de Vif y A3G en viriones nacientes de VIH-1.
- 1.4 Analizar el efecto que tiene la degradación de Vif por HDAC6 sobre la capacidad infectiva de viriones VIH-1.

### 2. Estudio del papel de HDAC6 sobre la proteína estructural Pr55-Gag

- 2.1 Estudiar si HDAC6 afecta a la estabilidad de Gag y qué dominios de HDAC6 podrían estar implicados en esta acción.
- 2.2 Analizar el efecto que tiene la degradación de Pr55-Gag por HDAC6 sobre la producción de viriones VIH-1 y su infectividad.
- 2.3 Confirmar el uso de la ruta autofágica como vía degradativa usada por HDAC6 para provocar la degradación de Pr55-Gag y por tanto, descartar el uso de la vía proteasómica para tal fin.
- 2.4 Estudiar cuales de las regiones ubiquitinables de Gag son necesarias para el reconocimiento por parte de HDAC6.

# 3

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

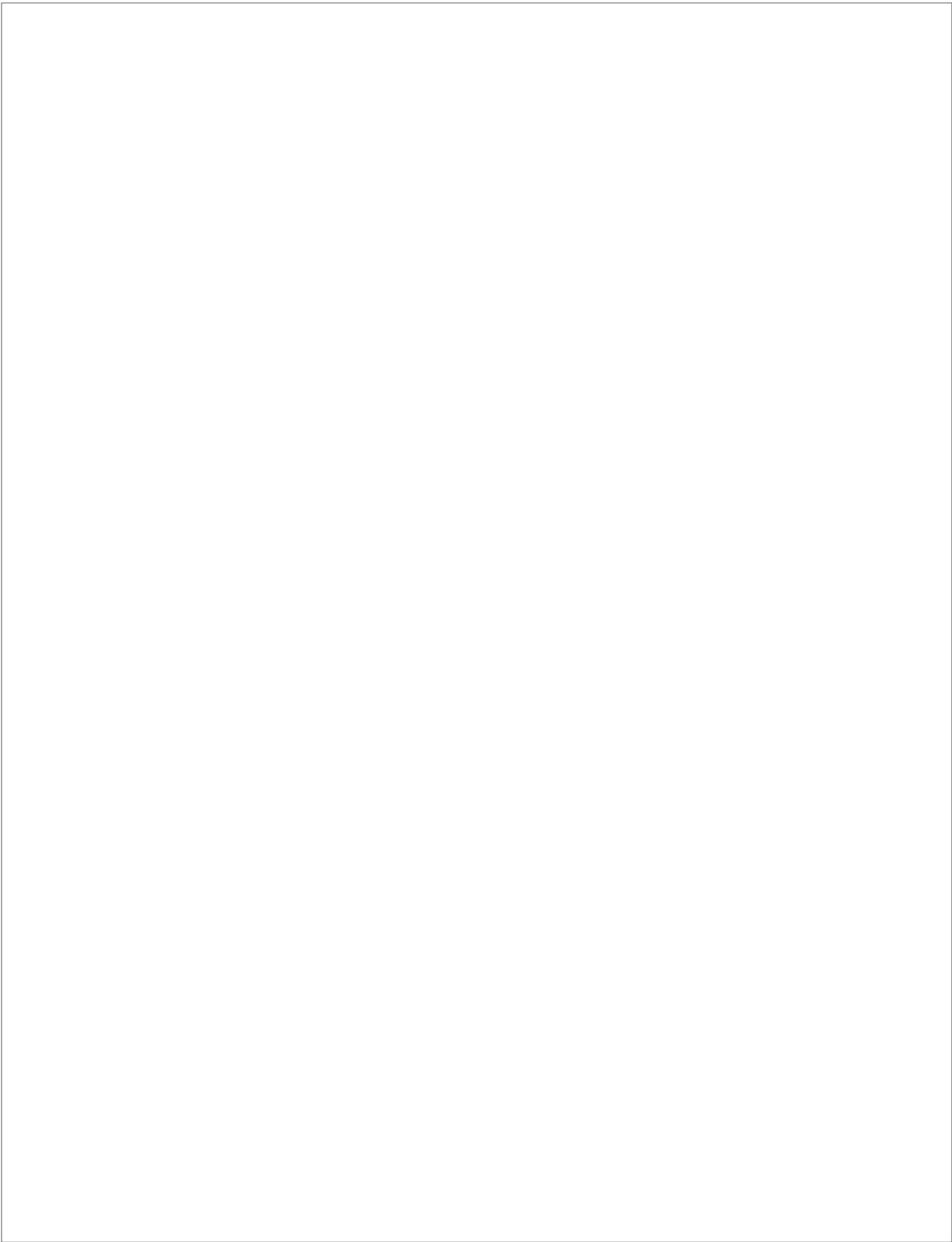
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

### 3.1 Materiales

#### 3.1.1 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se recogen en la siguiente tabla:

NOMBRE N.º. de Catálogo	EMPRESA	APLICACIÓN
A3G 9959	Dr. J-C Paillart	Western Blot
Alexa-Fluor 488 anti-Rabbit A11008	Invitrogen	Inmunofluorescencia
Alexa-Fluor 568 anti-Goat A11057	Invitrogen	Inmunofluorescencia
Alexa-Fluor 568 anti-Rabbit A11011	Invitrogen	Inmunofluorescencia
Alexa-Fluor 633 anti-Mouse A21126	Invitrogen	Inmunofluorescencia
Anti-Acetil Lysine AB3879	Merck Millipore	Western Blot
Anti-Acetilated Tubulin T7451	Sigma-Aldrich	Western Blot
Anti-FLAG M2 F1804	Sigma-Aldrich	Inmunoprecipitación
Anti-Human CD4 (RPA-T4) 16-0049-85	eBioscience	Ensayos de infección
Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP P0447	Dako	Western Blot
Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP P0448	Dako	Western Blot
Anti- $\alpha$ -Tubulin T6074	Sigma-Aldrich	Western Blot e inmunofluorescencia
Anti- $\beta$ -Actin A2228	Sigma-Aldrich	Western Blot

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

Anti-HIV1 p55+p24+p17 ab63917	Abcam	Western Blot
c-Myc (9E10) sc-40	Santa Cruz Biotechnology Inc	Inmunoprecipitación
GFP (FL) sc-8334	Santa Cruz Biotechnology Inc	Western Blot e inmunoprecipitación
HA-probe (F-7) sc-7392	Santa Cruz Biotechnology Inc	Western Blot, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación
HA-probe (Y-11) sc-805	Santa Cruz Biotechnology Inc	Inmunofluorescencia
HDAC6 (H-300) sc-11420	Santa Cruz Biotechnology Inc	Western Blot, inmunofluorescencia e inmunoprecipitación
HIV-1 Vif (319) sc-69731	Santa Cruz Biotechnology Inc	Western Blot
HSP 90 $\alpha/\beta$ (N-17) sc-1055	Santa Cruz Biotechnology Inc	Western Blot
PEBP2 $\beta$ (141,4,1) sc-56751	Santa Cruz Biotechnology Inc	Western Blot
SQSTM1 (D-3) sc-28359	Santa Cruz Biotechnology Inc	Western Blot

### 3.1.2 Reactivos

Los reactivos usados durante este trabajo se recogen en la siguiente tabla:

NOMBRE N.º. de Catálogo	EMPRESA	APLICACIÓN
3-Methyladenine (3-MA) M9281	Sigma-Aldrich	Inhibición de la formación de autofagosomas (Bloqueo de la autofagia)
Bafilomycin A1 B1793	Sigma-Aldrich	Inhibición de la bomba de protones V-ATPasa (Bloqueo de la autofagia)

Britelite plus	PerkinElmer	Sustrato de la enzima Luciferasa en los ensayos de infección con HeLaT2M-bl
Calpain Inhibitor I (ALLN) A6185	Sigma-Aldrich	Inhibición del proteasoma
DEAE-Dextran hydrochloride D9885	Sigma-Aldrich	Ensayos de infección
Fluoroshield with DAPI F6057	Sigma-Aldrich	Medio de montaje para las preparaciones de microscopia confocal
MISSION siRNA Universal Negative SIC001	Sigma-Aldrich	Oligo control <i>scrambled</i> usado en los silenciamientos
PEI25k	Polyscience	Transfección
Polybrene sc-134220	Santa Cruz Biotechnology	Ensayos de infección
rs-gp120 <sub>IIIB</sub>	Innogenetics	Inducción de la acetilación de Tubulina
$\beta$ -Gal Reporter Gene Assay	Roche	Sustrato de la enzima $\beta$ -Galactosidasa en los ensayos de infección con HeLa P5
Steady-Glo Luciferase Assay System	Promega	Sustrato de la enzima Luciferasa en los ensayos de infección con CEM.NK <sup>R</sup> -CCR5
X-Gal B4252	Sigma-Aldrich	Sustrato de la enzima $\beta$ -Galactosidasa para la detección de colonias positivas de bacterias transformadas
X-tremeGENE HP 06 366 236 001	Roche	Transfección en ensayos de producción de virus y pseudovirus

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

Z-Leu-Leu-Leu-al  
(MG132)  
C2211

Sigma-Aldrich

Inhibición del proteasoma

### 3.1.3 Soluciones de trabajo

Las soluciones de trabajo utilizadas se recogen en la siguiente tabla:

Nota: las concentraciones hacen referencia a la concentración final del producto en la solución. El pH fue ajustado en presencia de todos los componentes de la solución y siempre antes de llevar la solución al volumen final, siempre en agua miliQ (H<sub>2</sub>OmQ) a no ser que se indique lo contrario.

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN
Lower tris 4x	Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 SDS 0,4 % (w/v)
PBS 1X	NaCl 137 mM KCl 2,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 mM
Permeabilización	Tritón X-100 0.1 % (v/v) en PBS 1 X
Running	30 % Acrilamida/Bis 3,2 mL Lower Tris 2 mL TEMED 10 µL APS 64 µL Volumen final 8 mL
SDS-PAGE	Tris-base 25 mM Glicina 192 mM SDS 0,1 % (w/v) pH 8,3
Solución de bloqueo ( <i>Western Blot</i> )	Leche en polvo desnatada 5 % en TBS-t
Solución de bloqueo (inmunofluorescencia)	BSA 0,1 % (w/v) en PBS 1 X
Solución de Fijación	PFA 3 % (v/v) Glutaraldehido 2 % (v/v) PBS hasta completar volumen

Solución de lisis	NaCl 150 mM TrisHCl 50 mM pH 7,5 Tritón 1 % Deoxycolato sódico 0,5 % (v/v) Inhibidor de proteasas Complete (Roche) 1 X
Solución de lisis para IP	NaCl 150 mM TrisHCl 50 mM pH 7,5 Tritón 1 % PMSF 1 mM Inhibidor de proteasas Complete 1 X
Stacking	30 % Acrilamida/Bis 0,65 mL Upper Tris 1,25 mL TEMED 5 µL APS 25 µL Volumen final 5 mL
Stripping	Glicina 7,5 g SDS 0,5 g Tween-20 1 % (v/v) pH 2,2 Volumen final 500 mL
TAE	Tris base 40 mM Ácido acético glaciado 20 mM EDTA 2 mM
Tampón Laemmli 4X	Tris-HCl pH6.8 0,25 M SDS 0,4 g Glicerol 40 % (v/v) β-Mercaptoetanol 20 % (v/v) Azul de bromofenol 0,002 g Volumen final de 5 mL
TBS-t	Tris-Hcl 50 mM NaCl 150 mM Tween20 0,1 % (v/v)
Towbin	Metanol 20 % (v/v) Glicina 192 mM Tris-base 25 mM
Upper tris 4x	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 SDS 0,4 % (w/v)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

### 3.1.4 Medios y suplementos para los cultivos celulares.

Los medios y suplementos de cultivo usados en este trabajo son los siguientes:

NOMBRE N.º. de Catálogo	EMPRESA	APLICACIÓN
DMEM L0104	Biowest	Medio de cultivo para HEK 293T, HeLa P5 y TZM-bl
MycoZap prophylactic VZA-2031	Lonza	Complemento que se añade a todos los cultivos para prevenir la infección por micoplasma
RPMI1640 BE12-702F/U1	Lonza	Medio de cultivo para CEM.NK <sup>R</sup> -CCR5
Suero FBS Biowest S1810-500	Biowest	Suero para suplementar el medio de cultivo de HEK 293T, HeLa P5 y TZM-bl
Suero FBS Gibco 10270106	ThermoFisher Scientific	Suero para suplementar el medio de cultivo de CEM.NK <sup>R</sup> -CCR5

### 3.1.5 Líneas celulares.

Durante el desarrollo de este trabajo se usaron diferentes líneas celulares, todas ellas fueron cultivadas para su mantenimiento y durante los experimentos a una atmósfera controlada de 5 % de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37 °C. Todos los medios usados fueron suplementados con suero fetal bovino hasta una concentración del 10 % y con los antibióticos penicilina y estreptomina hasta una concentración del 1 %. Las células fueron pasadas con una frecuencia de 2 a 3 veces en semana.

CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5

(Cat. 4376, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program).

Proviene de la línea CEM.NK<sup>R</sup> (línea celular resistente a la lisis celular mediada por las células *Natural Killer* (NK)) las cuales han sido transducidas con un vector retroviral que las hace expresar el co-receptor CCR5 de manera constitutiva. Por lo tanto estas células son CD4<sup>+</sup>, CXCR4<sup>+</sup>, CXCR5<sup>+</sup>. No secretan virus y son adecuadas para los ensayos de infección ya sea con aislados primarios o con virus o pseudovirus producidos en el laboratorio. Crecen en suspensión formando pequeños agregados.

HEK 293T

(Cat. CRL3216™, American Type Culture Collection, ATCC®).

Línea celular proveniente de células renales embrionarias humanas. Modificadas para expresar el antígeno T del virus SV40, por lo que son competentes para la transcripción de vectores de expresión que posean la región de transcripción del SV40. Indicadas para producción de retrovirus, estudios de expresión génica y para producción de proteínas.

TZM-bl

(Cat. 8129, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)

Línea celular proveniente de HeLa, la cual tiene su origen en un adenocarcinoma humano. Han sufrido tranfecciones estables por lo que son CD4<sup>+</sup>, CXCR4<sup>+</sup> y CCR5<sup>+</sup>. Tienen bajo el control del LTR del VIH, el gen reportero de la β-Galactosidasa y de la Luciferasa por lo que al ser infectadas con virus y pseudovirus, producirán dicha enzima. Son muy apropiadas para estudios de infección. No es necesario el uso de antibióticos para mantener la expresión o presencia de los genes reporteros ni los receptores.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

HeLa P5

(Cedido amablemente por Dr. M. Alizon del Hôpital Cochin, Paris, Francia)

Línea celular que deriva de su parental HeLa. Estas células se encuentran transfectadas de manera estable con el correceptor CCR5 en fase de lectura con la proteína verde fluorescente (EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente potenciada). También presentan el gen reportero de la  $\beta$ -Galactosidasa bajo el control del LTR del VIH-1, por lo que al ser infectadas con virus o pseudovirus VIH, producirán dicha enzima. Son células adherentes y ampliamente usadas para estudios de infección célula-célula. Para la estabilización y expresión del gen reportero se ha de añadir al medio de cultivo Higromicina B (150  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y G418 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**3.1.6 Constructos de ADN.**

**3.1.6.1 Plásmidos virales**

PNL4-3

(Cat.114, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)

Provirus de VIH-1, su expresión da lugar a virus completos e infecciosos. Proviene de la clonación de dos aislados genómicos del virus (la región 5' del aislado NY5 y la región 3' del aislado LAV). Los virus resultantes presentan tropismo X4 y son virus completos e infectivos, por lo que su manejo ha de limitarse a laboratorios de seguridad biológica de nivel 2 o superior.

Mutantes pNL4-3 en Pr55-Gag

(Cedidos amablemente por el Dr. H.G.Kräusslich, Departamento de Virología, Hospital Universitario de Heidelberg, Alemania)

Set de siete vectores de expresión del virus VIH a partir del provirus pNL4-3 cuya proteína resultante de su gen *gag* ha sufrido cambio de lisina por arginina (KR) en diferentes regiones. Los virus resultantes de la expresión de estos

plásmidos son virus completos e infectivos, por lo que su manejo ha de limitarse a laboratorios de seguridad biológica de nivel 2 o superior. Los siete plásmidos presentan diferentes regiones con sus lisinas mutadas, la relación de los mismos es la siguiente:

- pNC(KR): Las diez lisinas de la región NC han sido mutadas a arginina.
- pSP2(KR): Las dos lisinas de la región SP2 han sido mutadas a arginina.
- pp6(KR): Las dos lisinas de la región p6 han sido mutadas a arginina.
- pNCSP2(KR): Las doce lisinas de NC y SP2 han sido mutadas a arginina.
- pNCp6(KR): Las doce lisinas de NC y p6 han sido mutadas a arginina.
- PSP2p6(KR): Las cuatro lisinas de SP2 y p6 han sido mutadas a arginina.
- PNCSP2p6(KR): Las catorce lisinas de NC, SP2 y p6 han sido mutadas a arginina.

#### PNL4-3.Luc.RE

(Cat.3418, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program).

Plásmido que porta el genoma del VIH-1 en el cual se ha insertado el gen de la Luciferasa en la posición del gen *env*, por lo que el virus resultante presenta un genoma *nef-*, *env-*, y *vpr-*. Este provirus resulta competente para un ciclo de infección, pero requiere la co-transfección de un vector que exprese el gen *env* para la producción de virus infecciosos.

#### pHXB2-*env*

(Cat. 1069, Lot. 040154, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program).

Vector de expresión que codifica para el gen *env* (gp160) del VIH-1, este gen proviene del clon Hxhc2. Esta proteína de envuelta presenta tropismo X4. Es usado

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

en co-transfección con un plásmido que codifica para el cuerpo viral, en concreto pNL4-3.Luc.R'E', para la producción de pseudovirus.

PCAGGS-SF162-gp160

(Cat. 10463, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program).

Vector de expresión que codifica para el gen *env* (gp160) del VIH-1, este gen proviene del clon SF162. Esta proteína de envuelta presenta tropismo R5. Es usado en co-transfección con un plásmido que codifica para el cuerpo viral, en concreto pNL4-3.Luc.R'E', para la producción de pseudovirus.

BaL.01

(Cat.11445, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program).

Vector de expresión que codifica para los genes *env* y *rev* de la cepa de VIH-1 BaL. La proteína de la envuelta resultante presenta tropismo R5. Es usado en co-transfección con un plásmido que codifica para el cuerpo viral, en concreto pNL4-3.Luc.R'E', para la producción de pseudovirus.

hVif

(Cat. 10077, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program).

Vector de expresión de la proteína viral Vif. Nos permite la expresión de dicha proteína en un contexto libre del resto de los componentes del virus.

Gag-GFP

(Cat.11468, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program).

Vector de expresión para la poliproteína Pr55-Gag en fase de lectura con el gen de la EGFP. Al carecer de la Proteasa viral la proteína Gag resultante estará sin procesar teniendo un tamaño estable de 55 KDa.

### 3.1.6.2 Plásmidos de proteínas celulares

#### A3G-3xHA, A3G-FLAG y A3G-myc

Vectores de expresión de la proteína APOBEC3G con una etiqueta de 3 epítomos de HA (corresponde a la región comprendida entre los aminoácidos 98 y 106 de la glucoproteína de superficie Hemaglutinina del virus de la gripe humana), la etiqueta FLAG y myc, respectivamente. Todas ellas en fase de lectura con A3G en su región C terminal. El vector de expresión es el pcDNA3.1 y están flanqueados por los sitios de restricción de EcoRI y XhoI. Estos vectores fueron diseñados en nuestro laboratorio en momentos previos a la realización de este trabajo gracias a la amable donación de un vector de expresión de A3G del Dr.B.R. Cullen, Carolina del Norte.

#### A3G-C97A y A3G-D128K

Vectores de expresión de dos mutantes de A3G que presentan cambio de aminoácido en las posiciones 97 y 128 respectivamente. Esto les confiere una resistencia a ser degradados por Vif, presentando en el segundo mutante, además, una baja capacidad de unión a Vif. Estos plásmidos fueron cedidos amablemente por el Dr.Jean-Christophe Paillart, Strasbourg.

#### EGFP-HDAC6wt, EGFP-HDAC6 $\Delta$ BUZ y EGFP-HDAC6 BUZ

Vectores de expresión que codifican para la proteína HDAC6wt (*wild-type*, salvaje, proteína de 1215 aminoácidos), para la proteína HDAC6 con su región BUZ delecionada (del aminoácido 1 hasta el 1091 de HDAC6) y para el fragmento BUZ (del aminoácido 841 al 1215 de la proteína), todo ellos en fase de lectura de la proteína EGFP en su región N terminal. Estas proteínas fueron clonadas en el vector pEGFP-C1 usando las enzimas BglII y Sall. Estos vectores fueron diseñados

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

en nuestro laboratorio en momentos previos a la realización de este trabajo a partir de otros vectores de expresión de estas mismas proteínas cedidos amablemente por el Dr. X-J Yan (McGill University Health Center, Montreal, Canada)

#### HA-HDAC6wt, HDAC6 ΔBUZ-HA y HA-HDAC6 BUZ

Vectores de expresión que codifican para la proteína HDAC6wt (*wild-type*, salvaje, proteína de 1215 aminoácidos), para la proteína HDAC6 con su región BUZ delecionada (del aminoácido 1 hasta el 1091 de HDAC6) y para el fragmento BUZ (del aminoácido 841 al 1215 de la proteína), todo ellos en fase de lectura del epítipo HA en su región N terminal. El plásmido de expresión para HDAC6\_ΔBUZ fue cedido nuevamente por el Dr. X-J Yan. En los otros dos casos, en PCRs usando la enzima EHF (*Expand™ High Fidelity PCR System*, Roche) y mediante oligos con la secuencia HA incorporada en el oligo *forward* fueron sintetizado los fragmentos HA-HDAC6wt y HA-HDAC6-BUZ, usando como molde los plásmidos descritos anteriormente. Finalmente, ambos fueron clonados con las enzimas HindIII y XbaI en pCDNA3.1. Estos vectores fueron diseñados en nuestro laboratorio en momentos previos a la realización de este trabajo.

#### HA-HDAC6dm

Vector de expresión que codifica para la proteína HDAC6 cuyos dominios con actividad desacetilasa han sido mutados con un cambio de aminoácido (la histidina fue sustituida por arginina, en su sitio activo (en concreto posiciones 216 y 611), perdiendo su actividad catalítica. Este plásmido fue diseñado para su uso en este trabajo mediante extracción del fragmento HDAC6 por PCR y posterior clonaje en el vector de expresión pcDNA3.1. El molde usado para la PCR fue el plásmido

HDAC6dm-GFP, cedido amablemente por Dr. F. Sanchez-Madrid, (Servicio de Inmunología del Hospital la Princesa, Madrid). Los oligos usados fueron:

**Fw** ACTTAAGCTTGCCACCATGTATCCATACGATGTTCCAGATTACGCTACCTCAACCGGCCA  
GGATTCC

**Rv** CGAGTCTAGATTAGTGTGGGTGGGGCATATCCTC

La enzima usada para la PCR fue la *Phire Hot Start II* (Cat.N°F-122S, *Thermo Scientific*). Tras obtener nuestro fragmento de HA-HDAC6dm, lo clonamos en un vector TOPO (*StrataClone Blunt PCR cloning kit* (Cat.N°240207, *Agilent Technologies*) para optimizar así la digestión de las enzimas de restricción que generarán los extremos apropiados para ser clonado en su vector final. Se usaron las bacterias *StrataClone SoloPack Competent Cells* (Cat.N°200185, *Agilent Technologies*) y se seleccionaron las colonias positivas usando el producto X-Gal. Finalmente se sometió a la acción de las enzimas de restricción HindIII y XbaI al plásmido HA-HDAC6dm-TOPO y pcDNA3.1, y usando la ligasa *T4DNA Ligase Kit* (Cat.N°2011A, Takara) finalizamos el clonaje de HA-HDAC6dm en el vector pcDNA3.1.

#### Ubiquitin-6xHis

(Cedido amablemente por Dr .M.S. Rodriguez, BioGune, Vizcaya)

Vector de expresión de la proteína ubiquitina con una etiqueta en fase de lectura de seis histidinas en su extremo C terminal. Estas histidinas presentan alta afinidad por iones metálicos tales como níquel y cobalto.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

### 3.1.7 Vectores de expresión

#### PcDNA.3.1

(Cat. V790-20, Invitrogen)

Vector de expresión usado para el clonaje de algunas de las construcciones previamente descritas. Además de ser usado como ADN compensatorio en las transfecciones.

#### PEGFP-C1

(Clontech)

Vector de expresión usado para el clonaje de algunas de las construcciones previamente descritas.

### 3.1.8 Oligos de interferencia.

#### siARN de HDAC6.

Para el silenciamiento de la proteína endógena de HDAC6 se usaron 3 oligos interferentes que unen en las regiones 193-213, 217-237 y 284-304 del ARN mensajero de HDAC6.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Transfección de cultivos celulares

Las células CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5 ( $3 \times 10^6$  por condición) fueron transfectadas mediante nucleofección con las cantidades especificadas de ADN o siARN en 100  $\mu$ L de solución de nucleofección (*Nucleofector Kit C*, Lonza). Después de ejecutar el programa de nucleofección específico (*Amaxa Biosystems Nucleofection System*, Programa X-001, Lonza) las células fueron recuperadas en medio suplementado con 20 % de suero y mantenidas en cultivo 24 horas.

Las células 293T fueron transfectadas con X-tremeGENE HP (para producción de pseudovirus y virus) o con PEI25k (para los ensayos de sobre-expresión de proteínas). Las células fueron sembradas 24 horas antes en placas de 12 pocillos ( $1 \times 10^5$  células por pocillo) y placas de 6 pocillos ( $3 \times 10^5$  células por pocillo) respectivamente. El ratio usado fue de 1:3 (por cada 1  $\mu$ g de ADN se usaron 3  $\mu$ L de agente de transfección). Las células fueron mantenidas en condiciones normales de cultivo 48 horas. Para los experimentos de silenciamiento estas células se transfectaron con el método de la nucleofección (*Amaxa Biosystems Nucleofection System*, Programa Q-001, Lonza).

### 3.2.2 Western Blot

48 horas después de realizar la transfección o silenciamiento, las células fueron recogidas y lavadas dos veces con PBS 1 X frío, y resuspendidas en la solución de lisis. Se dejaron 30 min. en hielo y posteriormente se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min. a una temperatura de 4 °C. La cuantificación de proteína total se realizó mediante el método del ácido bicinónico (*BCA protein assay kit*, Cat.N°712853, Novagen Calbiochem, Pierce) así, equivalentes cantidades de proteína total fueron diluidas en la solución Laemmli e incubadas a 95 °C

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

durante 5 min. Posteriormente, se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes usando geles de poliacrilamida del 10 % - 15 %. Una vez finalizada la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  (*Immobilon-P Transfer Membranes* Cat.Nº IPVH00010, Millipore) usando el sistema de transferencia Trans-blot Turbo (Bio-rad). Tras la transferencia la membrana fue incubada en la solución de bloqueo durante 30 min. a temperatura ambiente en agitación para posteriormente lavarla 3 veces durante 5 min. con TBS-t. Luego, se realizó la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante seguida en ambos casos por 3 lavados de TBS-t de 5 min. Las proteínas se detectaron mediante luminiscencia incubando la membrana con el sustrato de la peroxidasa (*Clarity western ECL Substrate*, Cat# 170-5061, Bio-rad) y la señal producida se registró con el ChemiDoc MP (Biorad). Las imágenes fueron analizadas mediante el programa Image Lab (Biorad).

Cuando se requirió realizar otros marcajes sobre la misma membrana se realizó un paso de *stripping* (eliminación de los anticuerpos primario y secundarios presentes en la membrana). Para ello se incubó la membrana a temperatura ambiente y en agitación constante con la solución de *stripping* durante 30 min. seguido de dos lavados de 10 min. cada uno con NaCl 50 mM y por último dos lavados de 5 min. con TBS-t. Finalmente, se realizó de nuevo el bloqueo de la membrana y los marcajes con los anticuerpos primarios y secundarios.

### 3.2.3 Ensayos de poliubiquitinación.

Para los ensayos realizados para estudiar los niveles de poli-ubiquitinación de A3G, se co-transfectaron células 293T, con PEI25K, los plásmidos de las proteínas de interés junto con el plásmido Ubiquitin-6xHis. Durante las 48 horas de expresión de las proteínas, la ubiquitinación de A3G promovida por Vif se

produce con las Ub-6xHis. Así, tras la lisis de las células y siguiendo el protocolo del fabricante de Ni-NTA *Magnetic Agarose Beads* (Cat.Nº36113, Qiagen), realizamos una precipitación. La cola de histidinas de las Ub presentan una alta afinidad por el níquel de las bolas magnéticas uniéndose a ellas y arrastrando con ellas a las proteínas a las cuales se encuentran unidas. De esta manera, obtenemos un concentrado de todas las proteínas ubiquitinadas y poliubiquitinadas. El resultado de la precipitación se analiza mediante *Western Blot*.

### 3.2.4 Inhibición de proteasoma y de la autofagia

Para inhibir la actividad del proteasoma se añadió al cultivo celular MG132 a una concentración final de 20  $\mu$ M o ALLN a una concentración final de 25  $\mu$ M. Para bloquear el proceso de la autofagia se añadió al cultivo celular 3-MA a una concentración final de 5 mM y Bafilomicina A a una concentración final de 100 nM, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En todos los casos se dejó actuar al inhibidor entre 4-5 horas antes de proceder a la recogida y lisis de las células, excepto el ALLN que se añadió 16 horas previas a la lisis. En todos los casos, como control, se añadió a otros pocillos el mismo volumen de DMSO que el añadido de los inhibidores.

### 3.2.5 Inmunoprecipitación

Para los ensayos de inmunoprecipitación (IP) se transfectaron células 293T con PEI25K los plásmidos de las proteínas de interés dependiendo del ensayo a realizar. Tras 48 horas de expresión se recogieron las células y tras dos lavados con PBS 1 X frío se incubaron durante 30 min. en hielo con la solución de lisis para IP y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 15 min. a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, se realizó una cuantificación de proteína total presente en el lisado celular mediante el método del ácido bicinonínico. Previo a la realización de la IP, se procedió al acoplamiento de los anticuerpos (Ac.) a bolas magnéticas

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

siguiendo las instrucciones del fabricante del kit *Dynabeads Antibody Coupling Kit* (14311D, Life Technologies). Para la realización del ensayo, se incubaron 25 µL de bolas acopladas a Ac. con 300 µg de proteína total sometidas a rotación a 4 °C durante 16 horas. Con la ayuda de una gradilla magnética se lavaron las bolas 3 veces con PBS 1 X a pH 7,4. Tras el último lavado se resuspendieron las bolas en 30 µL de Laemmli y se sometieron a 90 °C durante 10 min. para conseguir el desacoplamiento de los anticuerpos y la desnaturalización de las proteínas. El resultado de las IPs se analizó mediante la técnica del *Western Blot*.

### 3.2.6 Inmunofluorescencia

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células se sembraron sobre cristales previamente esterilizados con etanol y radiación UV. Estos cristales fueron tratados con *poly-D-Lysine* a 0,01 % en H<sub>2</sub>O para favorecer la adhesión de las células y evitar que estas se desprendiesen durante los lavados en el protocolo de marcaje. Se sembraron 200.000 células 293T por condición, 24 horas antes de la transfección. La transfección se realizó con PEI25K y tras 24 horas se lavaron los cristales 2 veces con PBS 1 X y se incubaron con la solución de fijación 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró la solución de fijación y tras 3 lavados con PBS 1 X se incubaron durante 2:30 min. con la solución de permeabilización. Tras 3 lavados con PBS 1 X se incubaron con la solución de bloqueo durante 30 min a temperatura ambiente. Tras lo cual se realizó la incubación de los anticuerpos primarios y secundarios (durante 1 hora y 30 min. respectivamente, el secundario en oscuridad) con los correspondientes 3 lavados con PBS 1 X tras cada incubación. El montaje de los cristales se realizó poniendo una pequeña gota del medio de montaje sobre un portaobjetos y colocando el cristal boca abajo sobre la gota. Se dejó secar 16 horas a temperatura ambiente en oscuridad y después se sellaron con laca de uñas transparente y se mantuvieron a 4 °C hasta su visualización y

análisis. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Leica TCS SP8 (Leica microsystem) y analizadas con el software MetaMorph.

### 3.2.7 Producción de partículas virales

Para estudiar las posibles variaciones en la infectividad de VIH provocadas en nuestras condiciones experimentales debidos producir nuestros propios stock virales. Para ello seguimos dos estrategias de producción, muy similares entre sí, pero que difieren en el tipo de virus producido.

#### 3.2.7.1 Producción de pseudovirus de VIH

Las partículas víricas producidas en este caso reciben el nombre de pseudovirus porque poseen un genoma defectivo en los genes *env*, *nef* y *vpr*, por lo que no son virus completos y sólo podrán realizar un ciclo de infección, por lo que resultan seguras para el trabajo en el laboratorio. Se sembraron  $1 \times 10^5$  células 293T por condición en placas de 12 pocillos en 1 mL de medio, 24 horas antes de la transfección. Las células se co-transfectaron, usando XtremeGENE, con el provirus pNL4-3.Luc.E-R y el plásmido de la envuelta, junto a los plásmidos de interés según las condiciones. 48 horas más tarde se recogió el sobrenadante del cultivo en el cual se encuentran las partículas virales producidas y se clarificó por centrifugación a baja velocidad (3.000 rpm, 4 min). El stock viral se usó fresco para los ensayos de infección siempre que fue posible, en caso contrario se guardó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.7.2 Producción de virus de VIH

Se sembraron  $3 \times 10^5$  células 293T por condición en placas de 6 pocillos en 2 mL de medio 24 horas antes de la transfección. Las células se co-transfectaron, usando XtremeGENE, con el provirus pNL4-3, o con los provirus pNL4-3 que presentan su gen *gag* mutado, junto con los plásmidos de interés. En estos casos no fue necesario co-transfectar el plásmido codificante de las proteínas de la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

envuelta, ya que estos provirus codifican para el genoma íntegro del virus. Pasadas 48 horas, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se clarificaron por centrifugación a baja velocidad (3.000 rpm, 4 min.). El stock viral se usó fresco para los ensayos posteriores de infección siempre que fue posible, en caso contrario se guardó a -80°C. El manejo de estas partículas virales funcionales fue llevado a cabo en un laboratorio de bioseguridad de nivel 3 (laboratorio acondicionado para el manejo de patógenos de riesgo elevado para el individuo pero de bajo riesgo para la colectividad).

### 3.2.8 ELISA de p24

La cuantificación de virus y pseudovirus presentes en los sobrenadantes clarificados se realizó mediante kit de ELISA de detección de p24 (proteína que compone la cápside viral, también denominada CA). Se usaron dos tipos de kit, uno no cuantitativo (*Genscreen HIV-1 Ag Assay 71120*, Bio-Rad) que nos permite conocer variaciones en la cantidad de p24 según las condiciones de producción, pero que no nos permite conocer la cantidad real, y otro kit cuantitativo (*INNOTEST HIV Antigen mAb*, 80563 Fujirebio) del cual obtenemos la cantidad exacta de p24 en ng. presente en nuestra muestra. Este dato, tanto el cuantitativo como el no cuantitativo, nos permite normalizar nuestros stock virales y corregir los valores de los ensayos de infección según la cantidad de virus.

### 3.2.9 Ensayos de infección

Para evaluar la capacidad infecciosa de los virus sintetizados en nuestras condiciones experimentales realizamos diferentes tipos de ensayos de infección.

#### 3.2.9.1 Ensayo de infección Luciferasa

En este tipo de ensayos, el gen *luciferasa* se encuentra insertado dentro del genoma viral y es expresado junto con el resto de los componentes virales cuando logra infectar de manera exitosa una célula. Se lleva a cabo usando pseudovirus de

VIH producidos a partir de la expresión de pNL4-3.Luc.R'E y un vector codificante para la proteína de la envuelta. En placas de 24 pocillos se dispusieron 900  $\mu\text{L}$  del stock viral, a los cuales se añadieron 2  $\mu\text{L}$  de Polybrene. El Polybrene es un polímero catiónico que actúa neutralizando la repulsión de carga existente entre la superficie del virus y algunos componentes de la superficie celular, por lo que incrementa la eficiencia de contacto virus-célula. Además, en la condición control negativa de infección se añadieron, 10  $\mu\text{L}$  de *Anti-Human CD4*. Este anticuerpo se une a los receptores CD4 de las células impidiendo la interacción del VIH con ellos y por tanto la entrada viral. El último paso consistió en añadir  $9 \times 10^5$  células CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5 por pocillo. Las placas se centrifugaron durante 2 horas a 1.200 rpm a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron en condiciones normales de cultivo durante 4 horas. Finalizado este tiempo, se eliminó el sobrenadante por centrifugación, desechando así el excedente de virus que no ha logrado infectar. Las células se resuspendieron en medio fresco, y se sembraron en placas de 12 pocillos. Dejándolas en incubación durante 72 horas. Pasado ese tiempo, se recogieron y lavaron con PBS 1 X y se resuspendieron con el sustrato de la Luciferasa. La lectura se realizó con un lector de placas Victor<sup>TM</sup> X5 (PerkinElmer). Los valores de luz registrados en nuestra condición negativa fueron tomados como control del ensayo, estos valores de luz se entiende que no son el resultado de una entrada del virus vía contacto con su receptor CD4, por lo que se interpretan como una señal *background* que no se ha de tener en consideración. Para tomar como válido un ensayo de infección, los valores de nuestra condición positiva han de, al menos, duplicar al valor de luz de nuestro control negativo.

### 3.2.9.2 Ensayo de infección de $\beta$ -Galactosidasa

Para medir la infección de los virus en el ensayo por  $\beta$ -Galactosidasa se sembraron en placas de 96 pocillos 10.000 células por pocillo de HeLaP5 durante 6

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

horas con el sobrenadante de virus clarificado. La condición negativa de infección, cuya relación con los valores de la condición positiva nos dará validez al ensayo, se conformó añadiendo *Anti-Human CD4* al pocillo. Pasado ese tiempo, se descartó el sobrenadante, desechando así el exceso de virus que no logró entrar en las células, y se añadió medio fresco. La infección se mantuvo en cultivo durante 48 horas. Finalmente, y siguiendo las instrucciones del fabricante del kit del sustrato de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa se midió la infección con un lector de placas Victor™ X5 (PerkinElmer). En este tipo de ensayo, son las células las que tienen en su genoma el gen reportero, en este caso el gen de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa bajo el control del LTR del VIH. Cuando el virus logra entrar en la célula infectando de manera exitosa, la producción de la proteína Tat del virus, que se une a la región LTR promoviendo la transcripción del genoma viral, producirá la expresión de  $\beta$ -Galactosidasa.

### 3.2.9.3 Cálculo de la TCID50/mL

El tercer método utilizado en este trabajo, para evaluar la infectividad de los virus sintetizados bajo nuestras condiciones, fue el cálculo de la TCID50 por mL. (*Tissue Culture Infective Dose 50 %*). La TCID50 nos indica la dosis necesaria de un stock viral para conseguir la infección del 50 % de nuestro cultivo celular, a mayor TCID50 menor capacidad infectiva tendrá el aislado viral. Para la obtención de este valor, en placas de 96 pocillos donde previamente se han añadido 100  $\mu$ L de medio, se añaden 25  $\mu$ L del stock viral y se hacen diluciones seriadas hasta completar la fila de la placa respetando el último pocillo. En un aparte se preparan células TZM-bl junto con DEAE-Dextrano (a una concentración final de 18  $\mu$ g/mL, es un poli-cation que cumple la misma función que el Polybrene), y se distribuyen poniendo 10.000 células por pocillo. Tras 48 horas de infección, se eliminan 150  $\mu$ L de sobrenadante y se añaden 50  $\mu$ L del sustrato de la Luciferasa. La luz emitida se

mide con un lector de placas. El resultado de la lectura se aplica en una plantilla de hoja de cálculo diseñada y validada por el equipo del Dr. Montefiori (Centro Universitario Médico de Duke, Carolina del Norte, EEUU) y la plantilla directamente nos da el valor de TCID<sub>50</sub>/mL del virus. Los valores de luz del último pocillo de la placa, donde sí habrán células sembradas, pero donde no habremos añadido virus, nos servirán para el cálculo de señal negativa a la infección. En este caso el valor es expresado mediante el denominador de la dilución que corresponde a un 50% de infección, por ello a mayores valores obtenidos por la plantilla mayor capacidad infectiva del virus.

### 3.2.10 Detección de proteínas en los pseudovirus nacientes

Para el estudio de las proteínas A3G y Vif encapsidadas en los viriones producidos de novo realizamos un análisis bioquímico de los pseudovirus. Para ello, el sobrenadante clarificado de las células productoras fue filtrado con jeringas de 1 mL (Ref: 300013, BD Plastipack) y filtros de acetato de celulosa de 0,2 µm de poro (Ref.Nº 10462200, *Whatman*). Es importante que el filtro sea de ese material para minimizar la pérdida de partículas víricas que se quedan adheridas al filtro de manera inespecífica. Posteriormente, se centrifuga el filtrado durante 4 horas a 13.000 rpm a 4 °C y se precipita la fracción más densa con acetona a -20 °C durante 16 horas. El *pellet* de proteína formado fue resuspendido en solución Laemmli, sometido a desnaturalización y analizado por *Western Blot*.

### 3.2.11 Análisis estadístico de los datos y representación.

Los datos de todos los experimentos fueron representados tomando el valor de nuestra condición control positiva como 1, y normalizando el resto de valores respecto a esa condición. La condición control en cada experimento se considera como la condición de expresión en solitario de proteínas virales (Vif o Pr55-Gag), o

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

A3G en los ensayos de bioquímica. Y en la producción de virus y pseudovirus, la condición de producción de virus en ausencia de HDAC6 o A3G.

Los datos fueron analizados con el programa informático GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc. San Diego. CA). Las gráficas finales de cuantificación representan las medias aritméticas de cada experimento replicado  $\pm$  SEM (*standard error of the mean*, error estándar de la media). Y el análisis estadístico utilizado para determinar la diferencia significativa entre las medias fue el test de ANOVA con posterior corrección de Bonferroni. El p valor en todos los casos fue 0,05.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

# 4

## RESULTADOS

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## 4.1 El complejo HDAC6/APOBEC3G regula la infectividad de VIH-1 induciendo la degradación autofágica de Vif.

### 4.1.1 Experimentos preliminares

Como paso previo a abordar nuestros objetivos, realizamos varios experimentos control para asegurar nuestras condiciones de trabajo. Comprobamos que nuestra línea celular 293T efectivamente no expresa de manera endógena el factor de restricción APOBEC3G (A3G) (**Fig. 4.1 A**, carril control) y que nuestras construcciones de A3G, independientemente del *tag* o etiqueta, se expresaban en buenos niveles al transfectar 0,5  $\mu\text{g}$  de cada plásmido en dichas células 293T (**Fig. 4.1 A** carriles A3G-3xHA, A3G-Flag, A3G-myc). Además, logramos reproducir en nuestras condiciones de trabajo el efecto de degradación de Vif sobre A3G. Para ello, transfectamos una cantidad constante de plásmido de A3G (0,5  $\mu\text{g}$ ) frente a cantidades variables de plásmido de Vif (1  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 0,25  $\mu\text{g}$ , 0,125  $\mu\text{g}$  y 0,0625  $\mu\text{g}$ ) en células 293T, posteriormente con el lisado de las células realizamos ensayos de *Western Blot* y confirmamos el efecto de Vif sobre A3G (**Fig. 4.1 B**). A menores cantidades de proteína Vif el efecto de degradación de A3G es cada vez menos evidente. Para comprobar que este efecto no se iba a ver condicionado por el *tag* de A3G repetimos el experimento usando esta vez una única condición para Vif (0,25  $\mu\text{g}$  de plásmido) en co-transfección con 0,5  $\mu\text{g}$  de cada plásmido de A3G (A3G-Flag y A3G-myc). En ambos casos los niveles de A3G se mostraron marcadamente disminuidos en presencia de Vif (**Fig. 4.1 C**).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

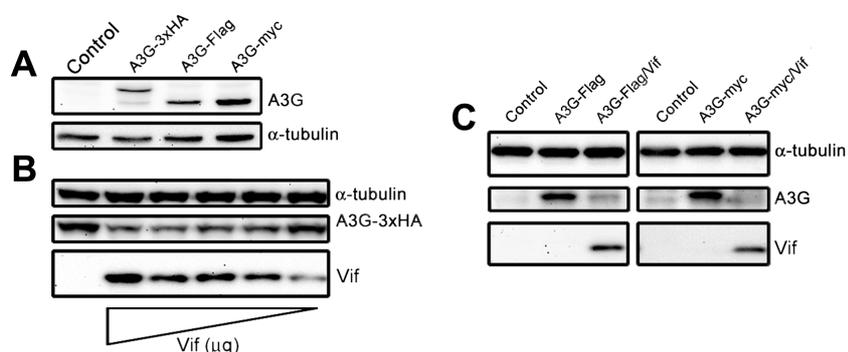


Figura 4.1: Efecto de la proteína viral Vif sobre A3G.

Imágenes representativas de Western Blot realizados para caracterizar nuestros constructos de A3G y Vif. A) Expresión de tres constructos de A3G con diferente tag. B) Estudio de la acción de Vif recombinante sobre A3G recombinante. C) El efecto de Vif se mantiene independientemente del tag de A3G.

Para finalizar nuestra caracterización de A3G y Vif realizamos una co-inmunoprecipitación con los lisados celulares de 293T, donde previamente habíamos expresado Vif en solitario o junto con A3G. Usamos en el ensayo un anticuerpo que reconoce el epítipo HA, por lo que arrastramos a nuestra proteína A3G con el tag de tres epítipos de HA y a todas las proteínas que interaccionen con ella. Revelamos el resultado final de la inmunoprecipitación mediante *Western Blot* y comprobamos que Vif únicamente era arrastrado en la condición donde A3G también había sido expresado (Fig. 4.2).

Tanto en estos ensayos de *Western Blot* como en los realizados a lo largo del trabajo usamos anticuerpos específicos para detectar Vif, pero A3G fue detectado mediante anticuerpos que reconocen su etiqueta (HA, FLAG o c-myc) a no ser que se indique lo contrario.

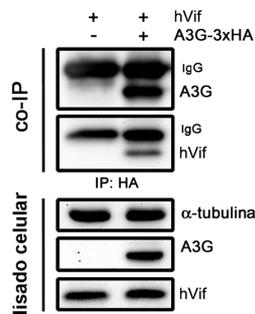


Figura 4.2: Co-inmunoprecipitación entre A3G y Vif. Imagen superior corresponde a la fracción co-IP y la inferior al lisado celular. La inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo que reconoce el tag de A3G y sólo en la condición donde hubo expresión de A3G-3xHA detectamos Vif en la fracción co-IP.

Con estos experimentos nos aseguramos que nuestras construcciones de A3G y Vif, nuestras células 293T, anticuerpos y condiciones y técnicas, lograban reproducir los resultados ya descritos y resultaban óptimas para el estudio que nos proponíamos.

Para comprobar que nuestro HDAC6 recombinante, era funcional decidimos reproducir alguno de los efectos descritos en la bibliografía. Para ello, realizamos dos tipos de controles. En primer lugar estudiamos los niveles de acetilación de dos sustratos conocidos y muy estudiados de HDAC6: HSP90 y la subunidad  $\alpha$  de la Tubulina ( $\alpha$ -Tubulina) en presencia de nuestra proteína recombinante. Transfectamos cantidades crecientes de plásmido codificante para HDAC6wt (*wild type* o salvaje) (0,5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 1,5  $\mu$ g y 2  $\mu$ g), lisamos las células y con estos lisados celulares, realizamos los estudios bioquímicos mediante *Western Blot*. Usamos anticuerpos específicos que detectan la  $\alpha$ -Tubulina acetilada y otro anticuerpo que reconoce de manera genérica todas las lisinas acetiladas. Tras este marcaje retiramos los anticuerpos mediante *stripping* de la membrana y marcamos con anticuerpos específicos las proteínas HSP90 y  $\alpha$ -Tubulina. En la imagen de **Fig. 4.3 A**, vemos que a mayor presencia de HDAC6, obtenemos mayores efectos de desacetilación de sus sustratos. Para la detección de HDAC6 usamos un anticuerpo

específico contra esta proteína, en esta ocasión y en el resto de ensayos realizados a continuación, a no ser que se especifique lo contrario.

También quisimos comprobar que nuestro HDAC6 recombinante, en la línea celular CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5, mantiene los efectos anti-VIH descritos. En linfocitos, la interacción de las proteínas de la envuelta viral con su receptor y co-receptor en la célula, provoca una remodelación del citoesqueleto celular que se evidencia en un aumento de la acetilación de la  $\alpha$ -Tubulina. Incubando CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5 con la proteína viral gp120 recombinante soluble (rs-gp120<sub>III</sub>B), mimetizamos el efecto sobre la  $\alpha$ -Tubulina (Fig. 4.3 B, comparación líneas 2 y 1). Al sobre-exresar 1  $\mu$ g de plásmido de HDAC6 y repetir las mismas condiciones, vemos impedida esa acetilación (Fig. 4.3 B, línea 4). El resultado final de esta menor acetilación de la  $\alpha$ -Tubulina es un impedimento en la formación del poro de fusión (183). Así, pudimos concluir que nuestro HDAC6 recombinante presenta las mismas funciones descritas hasta ahora en la bibliografía que la proteína endógena, incluso su función antiviral de impedimento de la entrada viral.

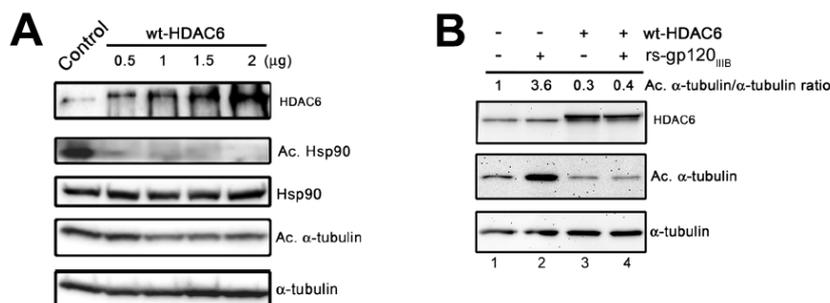


Figura 4.3: Estudio de la expresión y funcionalidad de HDAC6 recombinante.

A) Imagen representativa de la pérdida de formas acetiladas tanto de HSP90 como de  $\alpha$ -Tubulina debido a la expresión de HDAC6 recombinante. B) Imagen representativa del ensayo donde HDAC6 recombinante evita la acetilación de  $\alpha$ -Tubulina, necesaria para la formación del poro de fusión, promovida por el contacto de la proteína recombinante de la envuelta del virus, rs-gp120<sub>III</sub>B, en CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5.

De manera habitual y a lo largo del trabajo, decidimos mantener el marcaje de la acetilación de  $\alpha$ -Tubulina como un control de la función de HDAC6 cuando realizamos sobre-expresión o silenciamiento de esta proteína.

#### 4.1.2 HDAC6 no afecta a la estabilidad de APOBEC3G

Siendo HDAC6 una proteína implicada en procesos de “limpieza” celular, quisimos verificar que no provocaba de manera indiscriminada la degradación de proteínas sobre-expresadas y por tanto en exceso en la célula. Temíamos que HDAC6 pudiese afectar a la estabilidad de A3G, cuya presencia está fomentada por la transfección y expresión de un plásmido. Para ello, co-transfectamos frente a una cantidad fija de A3G-3xHA (0,5  $\mu$ g de plásmido) cantidades crecientes de HDAC6wt (*wild type*, proteína salvaje o no mutante) y realizamos ensayos de bioquímica. En el *Western Blot* marcamos HDAC6, A3G, y como controles del experimento, la acetilación de la  $\alpha$ -Tubulina y la  $\alpha$ -Tubulina total. La señal de la proteína A3G no se vio afectada por la presencia cada vez mayor de proteína HDAC6 (**Fig. 4.4 A**). Resultado evidente en la gráfica de las medias de intensidad de señal de A3G de varios experimentos (**Fig. 4.4 C**)

Decidimos, además, repetir el experimento en las mismas condiciones pero transfectando esta vez un plásmido que codifica para HDAC6- $\Delta$ BUZ (un mutante de HDAC6 el cual carece del dominio BUZ) ya que íbamos a trabajar con este mutante a la hora de estudiar la importancia de este dominio en la caracterización del nuevo papel antiviral de HDAC6 y queríamos comprobar que tampoco iba afectar a la estabilidad de A3G. Efectivamente vemos en la imagen de *Western Blot* y en la gráfica adjunta que HDAC6- $\Delta$ BUZ no parece tener efecto negativo sobre la estabilidad de A3G (**Fig. 4.4 B**). Descartamos por tanto cualquier efecto, tanto específico como aleatorio de HDAC6 sobre A3G por ser esta una proteína sobre-expresada en la célula.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

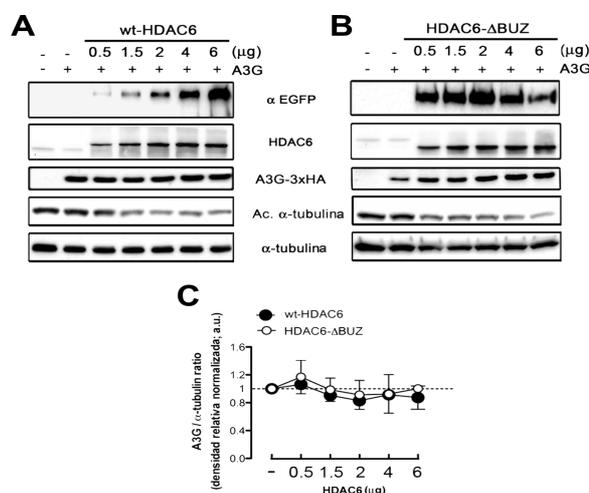


Figura 4.4: Estudio de la estabilidad de A3G en co-expresión con HDAC6. A) La expresión de HDAC6wt recombinante no afecta a la estabilidad de A3G-3xHA en células 293T. B) La expresión de HDAC6-ΔBUZ no hace variar la presencia de A3G-3xHA en células 293T. C) Gráfica que representa las medias de intensidad de A3G en presencia de HDAC6wt (puntos negros) y de HDAC6-ΔBUZ (puntos blancos) de varios experimentos. Los valores se normalizaron tomando la señal de A3G expresada en solitario como valor 1.

### 4.1.3 HDAC6 protege A3G promoviendo la degradación de Vif con importante implicación del dominio BUZ.

Una vez comprobado que podíamos reproducir la degradación de A3G por parte de Vif en nuestras condiciones y que nuestro HDAC6 era funcional para las acciones que se han descrito, estudiamos el efecto de una sobre-expresión de HDAC6 sobre los niveles de A3G en presencia de Vif. Realizamos experimentos de co-transfección en células 293T de las proteínas de interés en los cuales se decidió transfectar cantidades constantes de plásmido A3G (0,5µg) y de Vif (0,25 µg), frente a cantidades crecientes de plásmido HDAC6wt (desde 0,5 µg hasta 2 µg). Realizamos luego ensayos de *Western Blot*. En la imagen representativa de estos ensayos (Fig. 4.5), se observa la disminución habitual de A3G en las condiciones

donde hay co-expresión con Vif (**Fig. 4.5 A**, líneas 2 y 8 comparadas con líneas 1 y 7 respectivamente). Centrándonos en las condiciones con HDAC6wt, hay una disminución gradual de los niveles de Vif en el *Western Blot* y una recuperación de la señal de A3G (**Fig. 4.5 A**, comparando líneas 6 y 2). Los últimos pocillos de la imagen corresponden a experimentos en iguales condiciones pero transfectando, el plásmido para HDAC6- $\Delta$ BUZ en lugar de HDAC6wt. En este caso, aunque aparece una recuperación clara de los niveles de A3G (**Fig. 4.5 A**, comparando líneas de la 9 a la 12 con la 8) vemos que este efecto no parece estar acompañado por una bajada en la señal de Vif.

Estos efectos descritos se evidencian más claramente en las gráficas que acompañan a la imagen de *Western Blot*, donde se representa la media de intensidad de varios experimentos de las bandas de proteínas de Vif y de A3G normalizadas por la intensidad de señal de la Tubulina correspondiente para cada condición (**Fig. 4.5 B**, gráfica superior representan los valores para Vif y gráfica inferior la respuesta de A3G). Para Vif vemos que la sobre-expresión de HDAC6wt lleva a una pérdida progresiva de la señal de la proteína, efecto ausente con el mutante de HDAC6- $\Delta$ BUZ. En cambio, la gráfica para A3G nos indica que la presencia de ambas proteínas (salvaje o mutante) se acompaña con una mayor estabilidad de A3G a pesar de la presencia de Vif.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

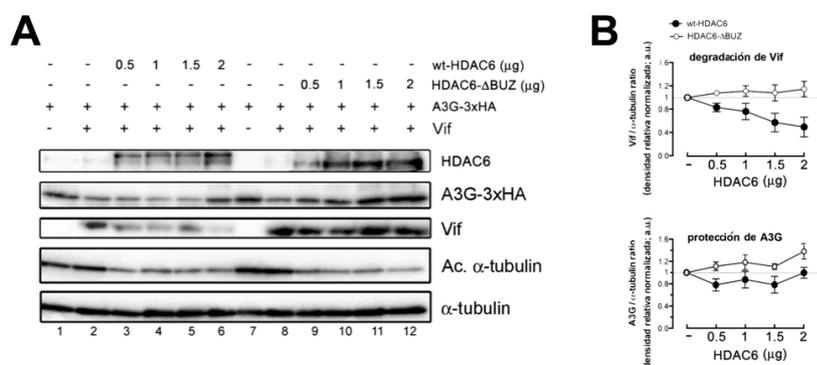


Figura 4.5: Estudio de la afectación de HDAC6 y HDAC6- $\Delta$ BUZ sobre A3G y Vif. A) Imagen representativa de los experimentos realizados, los primeros seis carriles corresponden al ensayo con HDAC6wt, cuya incremento lleva a una pérdida de señal de Vif con una recuperación progresiva de A3G, muy evidente en el carril 6. Los últimos seis carriles corresponden a las condiciones testadas con HDAC6- $\Delta$ BUZ, la señal de Vif permanece invariable en todas las condiciones, al igual que la señal de A3G. C) Gráficas de las medias de señal de Vif (gráfica superior) y A3G (gráfica inferior) de varios experimentos, los puntos negros corresponden a la condición HDAC6wt y los puntos blancos a la condición HDAC6- $\Delta$ BUZ. Los valores están normalizados por la señal de la proteína correspondiente expresada en ausencia de HDAC6. En el caso de A3G se tomó como referencia la señal de la proteína en presencia de Vif y ausencia de HDAC6.

#### 4.1.4 HDAC6 y APOBEC3G interaccionan de manera constitutiva.

La primera impresión tras estos resultados fue que, de alguna manera, HDAC6wt promueve la degradación de Vif y que como resultado A3G no se ve afectado por esta proteína viral. En cambio, en el caso del mutante HDAC6- $\Delta$ BUZ, que no logra promover la degradación de Vif pero sí la estabilización de A3G, nos llevó a pensar en un mecanismo adicional de protección del factor de restricción. Por ello, nos planteamos si HDAC6 y A3G interaccionarían en la célula en ausencia de un factor desencadenante como podía ser la presencia de Vif. Realizamos diversos experimentos de inmunoprecipitación en los cuales, arrastrábamos a HDAC6 (endógeno o sobre-expresado, según el experimento) y por tanto a todas las proteínas con las que interacciona. En sentido contrario también, a través del tag, arrastramos a A3G y a las proteínas con las que presentase interacción. Para

A3G no pudimos testar la proteína endógena ya que realizamos estos experimentos en células 293T, estas células son de tipo permisivo por lo que no expresan A3G de manera endógena. Con el purificado resultante de las inmunoprecipitaciones realizamos *Western Blot* para analizar los resultados.

Arrastrando A3G de un lisado celular donde sólo se expresó esta proteína y de otro lisado donde también se había sobre-expresado HDAC6wt, en ambos casos, detectamos HDAC6 en la fracción de la Co-IP (**Fig. 4.6**). En el primer caso estábamos arrastrando a la proteína endógena (**Fig. 4.6 A**) y en el segundo caso la proteína HDAC6wt recombinante (**Fig. 4.6 B**). Seguidamente, realizamos nuevas co-inmunoprecipitaciones pero arrastrando la proteína HDAC6 endógena de un lisado donde previamente se expresó A3G y en otra ocasión arrastramos la proteína HDAC6wt recombinante de otros lisados celulares donde también se expresó A3G. En estos ensayos, añadimos un condición adicional de co-expresión de HDAC6- $\Delta$ BUZ. En todos los casos detectamos A3G en la fracción de la Co-IP, resultados concordantes con las co-inmunoprecipitaciones anteriores (**Fig. 4.6 C y D**). Para descartar una afectación en las inmunoprecipitaciones debido a las etiquetas de las proteínas, realizamos un pequeño abordaje usando proteínas HDAC6 y A3G con diferentes etiquetas (HA para HDAC6 y Flag y myc para A3G). Pero el resultado de las inmunoprecipitaciones no varió con respecto a los resultados anteriores (**Fig. 4.6 E**), descartando cualquier resultado artefactado debido a las distintas etiquetas de las proteínas.

Con este pequeño abordaje, concluimos que HDAC6 y A3G interaccionan en la célula de manera basal, y que la región BUZ no resulta indispensable para esta interacción.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

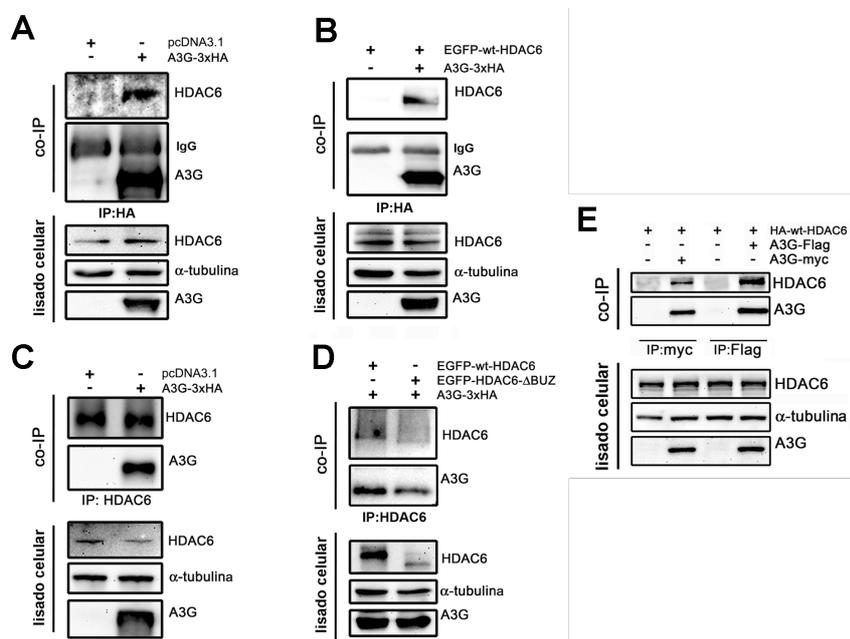
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



**Figura 4.6: Co-inmunoprecipitaciones de A3G y HDAC6.**  
 Se muestra la fracción de la co-IP en las imágenes superiores y los lisados celulares en las inferiores. A) Co-IP de la proteína HDAC6 endógena junto con A3G-3xHA, al usar un anticuerpo anti-HA para la inmunoprecipitación. B) Co-IP de la proteína HDAC6 recombinante junto con A3G-3xHA, al usar un anticuerpo anti-HA para la inmunoprecipitación. C) Co-IP de A3G-3xHA junto con la proteína HDAC6 endógena al usar un anticuerpo anti-HDAC6 para la inmunoprecipitación. D) Co-IP de A3G-3xHA junto con la proteína HDAC6wt (primer carril) y HDAC6-ΔBUZ (segundo carril), usar un anticuerpo anti-HDAC6 para la inmunoprecipitación. E) Inmunoprecipitaciones realizadas contra con tag myc (dos primeros carriles) y FLAG (dos últimos carriles) de A3G. La co-IP de HDAC6 fue positiva independientemente del tag de ambas proteínas.

Con el objetivo de comprobar más en profundidad la implicación del dominio BUZ de HDAC6 en la interacción con A3G, llevamos a cabo nuevas inmunoprecipitaciones en lisados celulares de 293T donde habíamos co-transfectado los plásmidos A3G-3xHA y HDAC6wt o HDAC6-ΔBUZ, o HDAC6-BUZ (este último plásmido codifica solamente para la región BUZ de HDAC6). Como la etiqueta de todos los constructos de HDAC6 fue GFP, usamos para la

inmunoprecipitación un anticuerpo específico contra este tag. De manera que arrastramos a todos nuestros constructos HDAC6 y las proteínas que interaccionen con ellos evitando diferencias en la inmunoprecipitación debido a menores afinidades del anticuerpo HDAC6 por las fracciones que presentan deleciones en su secuencia. Detectamos señal de la proteína A3G en la fracción de la Co-IP independientemente del fragmento de HDAC6 que se haya co-expresado con ella (Fig. 4.7). Suponemos que no existe una región única de interacción de HDAC6 con A3G, o en tal caso esta región resulta ser tan amplia que implica al dominio BUZ y a otras regiones de HDAC6.

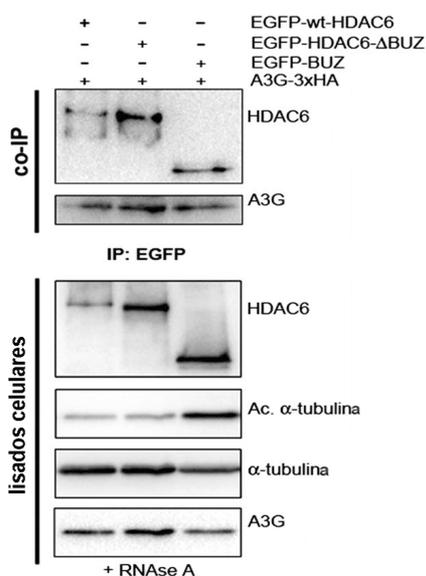


Figura 4.7: Co-inmunoprecipitación de los constructos de HDAC6 y A3G.

La IP se realizó contra el tag GFP de los constructos de HDAC6. Las imágenes superiores corresponden a la fracción de la co-IP y las imágenes inferiores a la fracción de lisados celulares. La proteína recombinante A3G-3xHA co-inmunoprecipitó en todas las condiciones. Las inmunoprecipitaciones se realizaron tras el tratamiento de los lisados celulares con RNasa A

En estos ensayos, previa a la inmunoprecipitación, los lisados celulares se sometieron a tratamiento con ARNasa. A3G tiene la capacidad de interaccionar con ácidos nucleicos, formando en la célula pequeños aglomerados de proteínas y

ARN, decidimos realizar dicho tratamiento para vislumbrar si esta interacción entre HDAC6 y A3G era dependiente o no de moléculas de ARN que actuaran como puente. La Co-IP positiva en todas las condiciones nos permite afirmar que la interacción entre HDAC6 y A3G se produce sin necesidad de la presencia de ARN.

Profundizando en la interacción y co-localización de estas proteínas, realizamos estudios de microscopía de fluorescencia confocal en células 293T. En primer lugar estudiamos la localización de A3G sobre el HDAC6 endógeno, por lo que tan solo transfectamos plásmido A3G-3xHA y usamos anticuerpos específicos que reconocían las proteína HDAC6,  $\alpha$ -Tubulina, y la etiqueta HA del A3G. Cada anticuerpo es reconocido de manera específica por otro de tipo Alexa que lleva acoplado un fluoróforo con distintas longitudes de onda de excitación y de emisión. De esta manera podemos detectar en una misma célula las tres proteínas a la vez sin que las señales de los fluoróforos se solapen.

El estudio de las imágenes nos mostró que la localización de A3G parecía coincidir en la célula con HDAC6 (**Fig. 4.8**). Diversos estudios describen la co-localización de HDAC6 con la  $\alpha$ -Tubulina, por ello el marcaje adicional de esta proteína, y la coincidencia que parece haber con las señales de A3G y  $\alpha$ -Tubulina (**Fig. 4.8**, imagen de solapamiento del área de zoom) nos apoya en nuestra idea de que HDAC6 y A3G colocalizan a lo largo de los microtúbulos siguiendo el patrón de HDAC6. Aunque también vimos regiones donde el solapamiento se produce en el citoplasma, independiente a la red de microtúbulos.

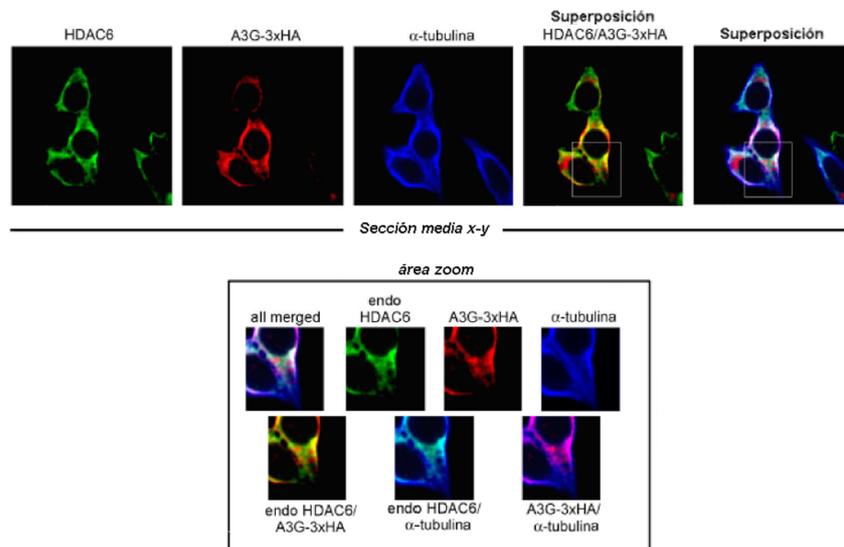


Figura 4.8: Microscopía confocal de la sobre-expresión de A3G-3xHA y del HDAC6 endógeno.

El ensayo se realizó en células 293T, mostramos el HDAC6 endógeno en color verde, la proteína recombinante A3G en rojo y la  $\alpha$ -Tubulina en color azul. Las zonas donde hay superposición de las señales de HDAC6 y A3G se muestran de color amarillo y la superposición de las señales de A3G y de  $\alpha$ -Tubulina en color fucsia. La región ampliada o zoom corresponde a la zona enmarcada por el cuadrado blanco de las imágenes superiores.

Repetimos los ensayos transfectando un plásmido para la proteína HDAC6wt, en este caso con la proteína GFP acoplada en fase con su marco de lectura, y por tanto sin necesidad de usar anticuerpos para detectar esta proteína, vemos que se repite el mismo patrón de co-localización (Fig. 4.9 A). Además, este fenómeno se mantiene independientemente de la etiqueta de HDAC6 o de A3G (Fig. 4.9 B), ya que obtuvimos los mismos resultados al transfectar un plásmido para HA-HDAC6wt y un plásmido de A3G con un tag diferente (FLAG en este caso). También estudiamos esta co-localización con el constructo HDAC6- $\Delta$ BUZ y el resultado fue nuevamente de co-localización positiva, con superposición de las señales de HDAC6- $\Delta$ BUZ, A3G y  $\alpha$ -Tubulina (Fig. 4.9 C).

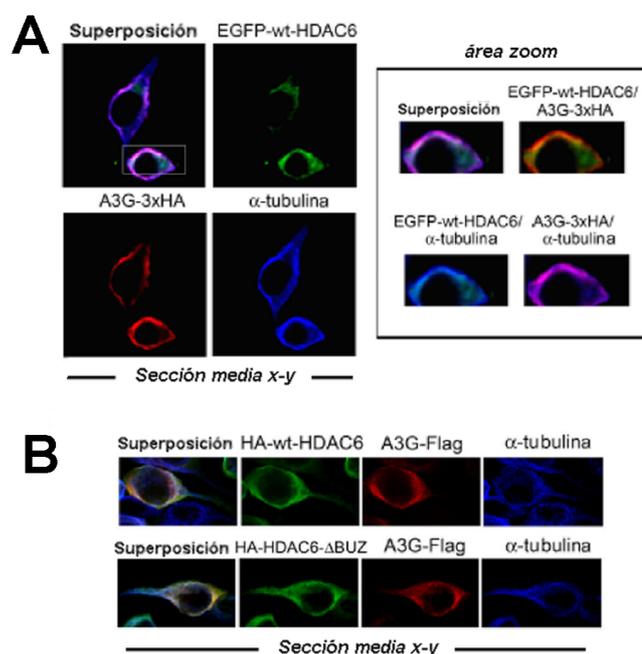


Figura 4.9: Microscopía confocal de sobre-expresión de A3G-3xHA y HDAC6.

Imágenes representativas de los ensayos de microscopía confocal de sobre-expresión de A3G y HDAC6 y marcaje de  $\alpha$ -Tubulina (señal en azul). A) Imágenes del ensayo en los cuales sobre-expresamos A3G-3xHA (señal en rojo) y GFP-HDAC6wt (señal en verde). La región ampliada o zoom corresponde al zona enmarcada por el cuadrado blanco de las imágenes de la izquierda. B) Imágenes del ensayo en los cuales sobre-expresamos A3G-FLAG (señal en rojo) y HA-HDAC6wt en el set de imágenes superior y HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ (señal en verde para ambas proteínas).

#### 4.1.5 HDAC6, A3G y Vif pueden interactuar de manera simultánea.

Llegados a este punto podíamos afirmar que la presencia de HDAC6wt induce la degradación de Vif, y como consecuencia A3G no es degradado. Además, ambas proteínas celulares co-localizan en la célula interactuando de manera basal sin necesidad de un estímulo externo. Es posible que esta interacción actúe de manera competitiva en el caso de HDAC6- $\Delta$ BUZ, ya que este mutante es incapaz

de inducir la degradación de Vif, pero sí de evitar la de A3G en presencia de la proteína viral.

Frente a estos resultados abordamos una nueva cuestión: ¿HDAC6 era capaz de reconocer a Vif directamente, o la presencia de A3G era indispensable actuando como un nexo entre las dos proteínas?. Realizamos de nuevo, IP en lisados 293T tras la co-transfección de plásmidos de HDAC6 (salvaje y mutante), A3G y Vif, arrastrando en el ensayo a la proteína viral. Estos experimentos se realizaron por duplicado, un set fue sometido a tratamiento con RNAsa previo a la realización de la inmunoprecipitación y el otro no. En los *Western Blot* resultantes, en la fracción Co-IP (independientemente del tratamiento) Vif arrastró consigo tanto a HDAC6wt como a HDAC6-ΔBUZ (**Fig. 4.10**, carriles 6, 7, 8 y 9) siendo el resultado indiferente a la presencia de A3G. Estos resultados nos confirman que HDAC6 interacciona con Vif directamente sin que A3G tenga que actuar como nexo entre ambas proteínas. Además, moléculas de ARN no parecerían participar en esta interacción. Por otro lado, la presencia de A3G o HDAC6 no parece afectar a la co-IP con Vif, por lo que suponemos que las tres proteínas interaccionan por regiones no idénticas y de manera simultánea.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

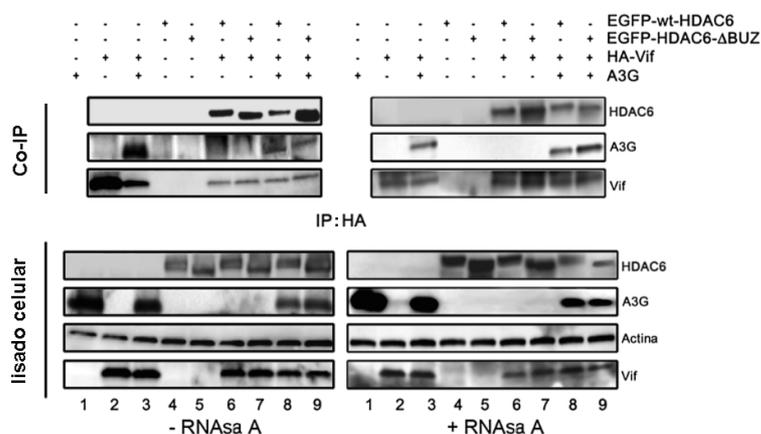


Figura 4.10: Co-inmunoprecipitaciones entre A3G, Vif y dos constructos de HDAC6. Las IP se realizaron contra el tag de A3G-3xHA. Las imágenes superiores corresponden a la fracción de co-inmunoprecipitación y las imágenes inferiores a la fracción de los lisados celulares. El conjunto de imágenes de la izquierda corresponde a la inmunoprecipitación realizada en lisados celulares sin tratamiento con RNasa A y el conjunto de imágenes de la derecha a la inmunoprecipitación realizada en lisados celulares tratados previamente con RNasa A. Se marcaron las proteínas A3G (mediante su tag), HDAC6 y Vif como proteínas de interés y la Actina como control de carga en la fracción de los lisados celulares. Estas tres últimas proteínas fueron marcadas con anticuerpos específicos.

Profundizando en este aspecto, realizamos colaboraciones con el Dr. Ricardo Madrid (BioAssays, Madrid) para realizar ensayos de *GST-pulldown*. En estos ensayos se expresaron nuestras proteínas de interés en un entorno procarionta y usamos la etiqueta GST para realizar la precipitación. El resultado de estos experimentos nos permite saber si dos o más proteínas interactúan directamente entre sí o si son parte de un complejo de más componentes, ya que tanto la expresión de las proteínas como el ensayo fue realizado en bacterias, así, una co-P positiva en ausencia del resto de proteínas celulares indica una interacción directa. Estos resultados nos mostraron que se producía interacción entre los diferentes mutantes de HDAC6 tanto con A3G como con Vif. Imágenes representativas de estos experimentos se muestran en el artículo científico presente en el Anexo I.

#### 4.1.6 HDAC6 afecta a los niveles de ubiquitinación de A3G promovidos por Vif.

Vif promueve la degradación de A3G mediante una poli-ubiquitinación de la proteína que supone para la célula la señal de degradación por el proteasoma. Nos planteamos si HDAC6 podía afectar a este evento de poli-ubiquitinación de A3G. Para ello, realizamos ensayos de co-transfección en células 293T con los plásmidos A3G-3xHA (0,5 µg), Vif (0,25 µg), HDAC6wt y HDAC6-ΔBUZ (2 y 5 µg) y en todas las condiciones el plásmido Ub-6xHis (2 µg, este plásmido codifica para la Ubiquitina con la etiqueta en tándem de 6 histidinas). Después de lisar las células, el lisado se somete a precipitación usando bolas magnéticas de Níquel, que presenta una alta afinidad por la cola de histidinas de la Ubiquitina recombinante. Así, en la fracción de precipitación tendremos todas las proteínas que presenten poli-ubiquitinación con este tipo de Ubiquitina y el resto de proteínas que interaccionen con ellas. Con el resultado se realiza un *Western Blot* donde marcamos nuestro A3G y observamos un multibandeado que corresponde a los diferentes grados de poli-ubiquitinación de la proteína. La presencia de Vif lleva a un aumento en ese bandeo, con mayor presencia de formas de A3G poli-ubiquitinadas con respecto a una condición basal (**Fig. 4.11 A**, comparando carril 2 con carril 1 de la imagen de co-P). Con la sobre-expresión de HDAC6wt el grado de poli-ubiquitinación de A3G aparece drásticamente disminuidos (**Fig. 4.11 A**, comparando carriles 3 y 4 con carril 2). En cambio, la presencia de HDAC6-ΔBUZ, el bandeo de formas ubiquitinadas de A3G es incluso mayor que el promovido por Vif (**Fig. 4.11 A**, comparando carriles 5 y 6 con carril 2).

Seguidamente, repetimos el estudio de poli-ubiquitinación de A3G, pero en esta ocasión induciendo el silenciamiento de la proteína HDAC6 endógena mediante el uso de ARNi en células 293T. Nuestros resultados revelaban que en

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

condiciones de menor presencia de HDAC6 el multibandeado de las formas ubiquitinadas de A3G aumenta considerablemente en presencia de Vif, en comparación de una condición control *scrambled* donde la expresión de HDAC6 endógeno tiene niveles basales (Fig. 4.11 B, comparando carril 4 con carril 2). A parte del marcaje de la proteína endógena, que nos revela la efectividad del silenciamiento, también observamos la respuesta en la acetilación de  $\alpha$ -Tubulina. La banda de esta proteína es de mayor tamaño e intensidad que en el marcaje de la condición control, este efecto nos sirve de control funcional del silenciamiento.

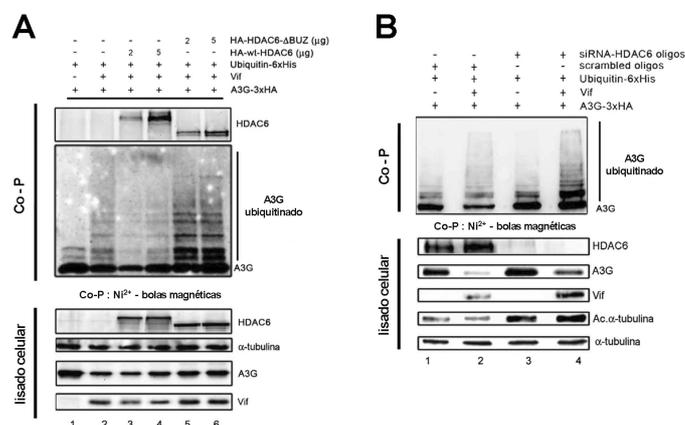


Figura 4.11: Estudio de los niveles de ubiquitinación de A3G.

El ensayo se realizó mediante co-precipitación de las formas poli-ubiquitinadas de A3G en condiciones de sobre-expresión de HDAC6wt (condiciones 3 y 4) y de HDAC6- $\Delta$ BUZ (condiciones 5 y 6). Las imágenes superiores corresponden a la fracción de la co-precipitación realizada con bolas magnéticas de Níquel, las ubiquitininas que forman las cadenas de marcado de A3G poseen un tag de 6 histidinas con alta afinidad por las bolas de Níquel. Las imágenes inferiores corresponden al estudio de la fracción de lisados celulares previos a la precipitación. Imagen representativa del estudio de los niveles de ubiquitinación de A3G realizado mediante co-precipitación de sus formas poli-ubiquitinadas en condiciones de silenciamiento de la proteína HDAC6 endógena (condiciones 3 y 4). Las imágenes superiores corresponden a la fracción de la co-P realizada con bolas magnéticas de Níquel. Las imágenes inferiores corresponden a la fracción de lisados celulares.

Los resultados de estos dos últimos ensayos, nos permiten concluir el siguiente escenario: HDAC6wt al promover la degradación de Vif evita que éste

actúe y por lo tanto, evita que A3G sea poli-ubiquitinado. Además, el silenciamiento de HDAC6 nos indica que la proteína endógena presenta este mismo efecto de protección de A3G que el observado con el HDAC6 recombinante. Por otra parte, aunque habíamos observado que HDAC6- $\Delta$ BUZ provoca una protección de A3G en presencia de Vif, estos experimentos nos reflejan que no logra evitar que A3G sea poli-ubiquitinado como marcaje para su degradación proteasómica. Es posible que HDAC6- $\Delta$ BUZ por interacciones que no implican al dominio BUZ se una a A3G evitando que sea degradado a pesar de su marcaje. Por ello encontramos un aumento en las formas poli-ubiquitinadas de A3G en presencia de Vif y de este mutante de HDAC6.

#### 4.1.7 HDAC6 media la degradación de Vif independientemente de la interacción entre Vif y A3G

Gracias a la amabilidad y colaboración con el Dr. Jean-Christophe Paillart y su equipo tuvimos a nuestra disposición dos mutantes de A3G ampliamente estudiados y utilizados en los estudios sobre la relación existente entre Vif y A3G. Ambos mutantes presentan un único cambio de aminoácido en diferentes regiones que le confieren características dispares. El primer mutante, llamado A3G C97A, presenta un cambio de aminoácido (de cisteína a alanina) en la posición 97 de la secuencia. Esta modificación le confiere resistencia a la degradación promovida por Vif, a pesar de mantener intacta la capacidad de interacción con la proteína viral con afinidades muy cercanas a la proteína A3G salvaje. En cambio, sí es sensible a que Vif evite su encapsidación y por tanto actividad. Este mutante presenta una capacidad limitada para multimerizar y aunque se describió como incapaz de formar parte de complejos HMM (*High molecular mass*, complejos de alto peso molecular), trabajos posteriores vieron que aunque sigue presentando esta capacidad, se encuentra altamente limitada (255–257). Por otro lado, el segundo

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

mutante denominado A3G D128K, presenta un cambio de aminoácido (de aspartato a lisina) en la posición 128 de la secuencia. Esta modificación no afecta a la capacidad de la proteína de multimerizarse, encapsidarse, formar parte de complejos HMM, y aunque presenta cierta capacidad de interacción con Vif, ésta es muy lábil pero, en cambio, a pesar de todo ello resulta insensible al efecto pro-degradativo de la proteína viral. Pero si resulta sensible a la degradación promovida por Vif-SIV (proteína Vif del Virus de la Inmunodeficiencia de Simios). Por lo que se cree que ese aminoácido resulta esencial en la especificidad de interacción y reconocimiento entre especies.

Para verificar que las características de A3G, su sensibilidad a ser degradado por Vif o su capacidad de interacción con la proteína, no afectaba al efecto de degradación de HDAC6 sobre Vif. Analizamos por ensayos bioquímicos de *Western Blot* los lisados de células 293T que previamente habían sido transfectadas con Vif (0,25 µg de plásmido), A3G (mutantes C97A o D128K, 0,5 µg de plásmido) y HDAC6wt (0,5 µg y 2 µg de plásmido). En estos experimentos el marcaje de A3G se realizó con un anticuerpo específico contra la proteína cedido por el Dr. J-C Paillart, ya que estas proteínas recombinantes carecen de tag. En nuestros resultados comprobamos la resistencia de estos mutantes A3G a ser degradados por Vif y observamos que la presencia de estos mutantes parecía afectar al efecto que HDAC6 ejerce sobre Vif. (Fig. 4.12)

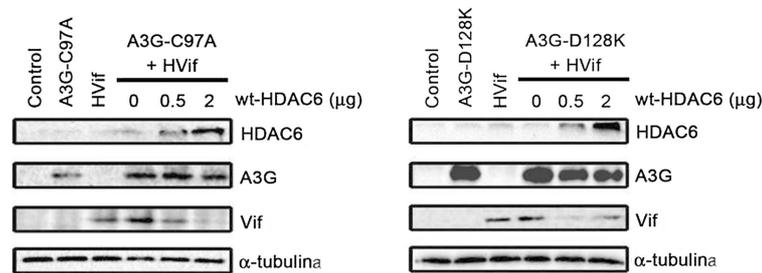


Figura 4.12: Ensayo de degradación de Vif en presencia de dos mutantes de A3G.

La imagen representativa de los Western Blot realizados con el mutante A3G\_C97A corresponde a la imagen izquierda, mientras que la imagen representativa de los ensayos con el mutante A3G\_D128K corresponde a la imagen derecha. En ambos casos vemos la pérdida de señal de Vif debido a la presencia aumentada de HDAC6 independiente de la presencia de los mutantes A3G.

Para estos mutantes, aprovechando la colaboración con el Dr. Ricardo Madrid, testamos mediante ensayos de GST-pulldown, su capacidad de interacción con HDAC6 y Vif, y observamos que ambos mutantes interaccionan con los diferentes constructos de HDAC6 y confirmamos en estos ensayos la buena interacción entre Vif y A3G-C97A y la débil unión entre Vif y A3G-D128K. Imágenes representativas de estos experimentos se muestran en el Anexo 2.

#### 4.1.8 La degradación de Vif promovida por HDAC6 depende de su dominio BUZ

Para profundizar un poco más en la relación entre HDAC6 y Vif, y viendo que A3G no resulta indispensable, decidimos realizamos una serie de experimentos en ausencia de A3G. En primer lugar, nuevamente llevamos a cabo ensayos de co-transfección en células 293T, de plásmidos que codifican para ambas proteínas y realizamos posteriormente Western Blot de los lisados celulares. Transfectamos una cantidad fija de plásmido de Vif (0,25 μg) frente a cantidades crecientes de HDAC6wt (0,5 μg, 1 μg, 1,5 μg y 2 μg) y en otras condiciones, mismas cantidades crecientes de plásmido HDAC6-ΔBUZ. La sobre-expresión de HDAC6wt, claramente,

se ve acompañada por un descenso en la señal de Vif (**Fig. 4.13**, carriles del 3 al 6 en comparación con carril 2), en cambio la señal de esta proteína viral en co-expresión con HDAC6- $\Delta$ BUZ no se ve afectada (**Fig. 4.13**, carriles del 9 al 12 en comparación con carril 8). Las gráficas adjuntas a las imágenes, representan los valores medios de intensidad de señal de Vif de varios experimentos, y se observa más claramente el efecto que describimos (**Fig. 4.13**, gráfica izquierda). Estudios recientes han demostrado la importancia de la proteína CBF- $\beta$  (*Core-binding factor subunit beta*, subunidad beta del factor de unión al sitio principal) en la nucleación del complejo ubiquitina ligasa promovido por Vif y especialmente se relaciona la presencia y unión con Vif de este factor con la estabilidad de la proteína viral dentro de la célula (XX, XX). Por ello, marcamos también en el *Western Blot* la proteína CBF- $\beta$  para descartar que la degradación de Vif estuviese provocada por una afectación de este factor y no fuese un efecto directo de HDAC6 sobre Vif. Tanto en la imagen representativa del experimento, como en la gráfica adjunta (**Fig. 4.13**, gráfica derecha), se muestra que CBF- $\beta$  permanece invariable a la expresión aumentada tanto de HDAC6wt, como de HDAC6- $\Delta$ BUZ (**Fig. 4.13**). Así, afirmamos que HDAC6 actúa sobre Vif de una manera directa y no como consecuencia de una mayor inestabilidad de la proteína por no poder formar la nucleación de su complejo.

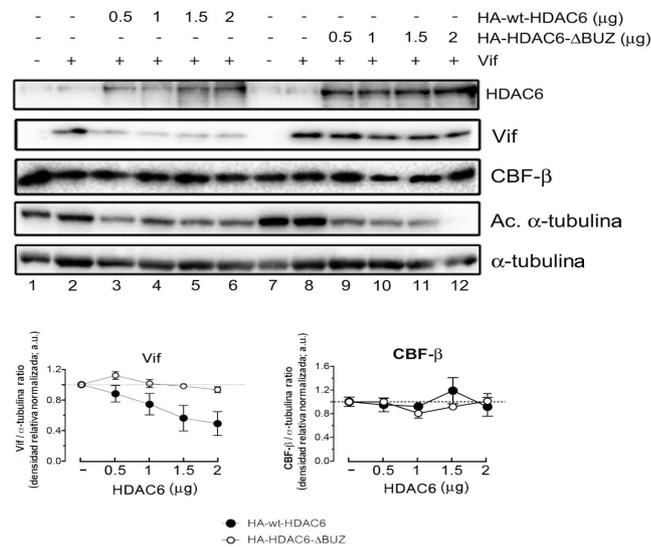


Figura 4.13: Estudio del efecto degradativo de HDAC6 sobre Vif en ausencia de A3G.

Los seis primeros carriles de la imagen corresponden al ensayo realizado en presencia de HDAC6wt y los seis últimos carriles al ensayo realizado en presencia de HDAC6-ΔBUZ. También se representa la señal de la proteína endógena CBF-β como control de que HDAC6 no esté afectando a este factor, indispensable en la nucleación y estabilidad de Vif. Las gráficas inferiores representan los valores medios de varios experimentos de las señales de Vif (gráfica izquierda) y las señales de CBF-β (gráfica derecha) en presencia de HDAC6wt (puntos negros) y en presencia de HDAC6-ΔBUZ (puntos blancos). Los valores se han representado normalizados por las señales de ambas proteínas en la condición de no expresión de HDAC6 (condiciones 2 y 8 respectivamente para cada constructo de HDAC6).

En los experimentos donde estudiamos la poli-ubiquitinación de A3G en condiciones de silenciamiento de HDAC6 endógeno, ya observamos un efecto positivo en la señal de Vif en la condición silenciada (Fig. 4.11 carril 4 de la fracción de lisado celular). Igualmente, decidimos verificar este efecto silenciando la proteína HDAC6 endógena junto con una sobre-expresión de Vif, en ausencia del resto de proteínas presentes en los ensayos anteriores. En estos ensayos, la banda de Vif estaba notablemente aumentada con respecto a la condición control

*scrambled*. Además, CBF- $\beta$ , permanece invariable a pesar del silenciamiento (Fig. 4.14, imagen y gráfica adjunta).

Con estos resultados confirmamos que HDAC6 ejerce un efecto negativo directo sobre la proteína viral Vif. Este efecto no es consecuencia de la afectación de CBF- $\beta$ , factor indispensable en la nucleación del complejo ubiquitina ligasa y que afecta a la estabilidad de la proteína viral.

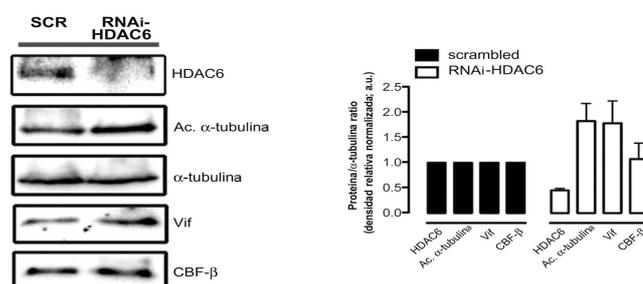


Figura 4.14: Estudio de la estabilidad de Vif en condiciones de silenciamiento de HDAC6. Mediante el uso de ARNi específico, se silenció la proteína HDAC6 endógena. Analizamos los resultados por Western Blot. También se marcó la proteína CBF- $\beta$  para comprobar su afectación por el silenciamiento de HDAC6. La gráfica adjunta representa los valores de varios experimentos de las señales de todas las proteínas marcadas.

#### 4.1.9 HDAC6 induce la degradación de Vif de manera dependiente de su dominio BUZ y de su capacidad desacetilasa.

El siguiente abordaje fue estudiar la implicación de los diferentes dominios de HDAC6 en la promoción de la degradación de Vif. Para ello, realizamos experimentos de co-transfección en células 293T usando cuatro plásmidos diferentes para la sobre-expresión de HDAC6. Dos de ellos ya usados anteriormente son los que codifican para las proteínas salvaje y mutante  $\Delta$ BUZ. Los otros dos plásmidos codifican uno para la fracción BUZ de la proteína y el cuarto para un HDAC6 recombinante de mismo tamaño y secuencia que la proteína salvaje pero que presenta dos mutaciones puntuales en ambos dominios catalíticos

por lo que carece de actividad desacetilasa (HDAC6dm, *double mutant*, doble mutante). Otra vez, transfectamos una cantidad fija de plásmido codificante de Vif (0,5 µg) frente dos cantidades de los plásmidos HDAC6 (0,5 µg y 2 µg). Las imágenes de *Western Blot* resultantes de estos experimentos con las proteínas HDAC6wt y HDAC6-ΔBUZ confirman el fenómeno descrito anteriormente (**Figs. 4.1 y 4.13**). En el ensayo realizado con la fracción BUZ de HDAC6 se repite la respuesta vista con HDAC6wt, reafirmando la idea de la relevancia de este dominio en la acción degradativa de Vif. La novedad apareció en los resultados obtenidos con HDAC6dm, donde la pérdida de la función deacetilasa se revela con una pérdida también de la capacidad de HDAC6 de promover la degradación de Vif (**Fig. 4.15**).

Como control de la funcionalidad de HDAC6 analizamos siempre la cantidad de α-Tubulina acetilada, y vemos como con las expresiones de BUZ y HDAC6dm la señal de α-Tubulina acetilada se mantiene estable o incluso se ve aumentada en el último caso.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

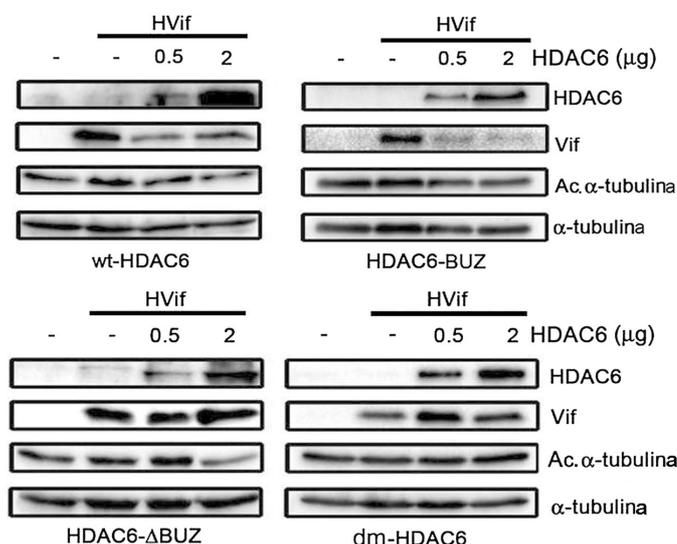


Figura 4.15: Estudio de la implicación de las diferentes regiones de HDAC6 sobre Vif. La imagen superior izquierda corresponde al ensayo realizado como control del efecto habitual de HDAC6wt. Las siguientes imágenes en el sentido habitual de lectura corresponden a los ensayos con la fracción BUZ, el mutante HDAC6-ΔBUZ, y el mutante HDAC6dm respectivamente.

#### 4.1.10 HDAC6 induce la degradación de Vif vía autofagia.

Nuestro siguiente paso fue averiguar mediante que vía de degradación presente en la célula, HDAC6 provoca la degradación de Vif. Las dos vías típicas que decidimos estudiar fueron la vía del proteasoma y la vía de degradación autofágica. Para ello, utilizamos las construcciones de HDAC6 que mostraron un efecto positivo en la degradación, es decir HDAC6wt y la fracción BUZ, realizando ensayos de co-transfección idénticos a los realizados en los experimentos anteriores. En esta ocasión, entre cuatro-cinco horas previas a la lisis de las células provocamos la inhibición del proteasoma (mediante el uso del inhibidor específico MG132) o la inhibición de la autofagia (mediante el uso del inhibidor 3-MA). Dependiendo de la

vía usada por HDAC6 para provocar la degradación de Vif, deberíamos ser capaces con este bloqueo de detectar un consecuente bloqueo de esta degradación.

Las imágenes de *Western Blot* resultantes nos indican que, la inhibición del proteasoma no conllevó un bloqueo de la degradación de Vif, en cambio al inhibir la vía de la autofagia, la sobre-expresión de cualquiera de los dos constructos de HDAC6 no provocó la ya observada degradación de Vif (**Fig. 4.16 A y B**, condiciones con MG132). Además, en estos experimentos vimos un efecto relevante que apoyaba la idea de que Vif estaba siendo degradada por la vía autofágica. Observamos que al someter a la células a un bloqueo de sus proteasomas, no sólo no provocábamos la estabilización de Vif si no que la degradación parecía fomentada en comparación con las mismas condiciones en los experimentos control sin inhibidor. Este efecto se evidencia mejor en la gráfica de cuantificación adjunta, donde se representa el descenso de las señales de Vif comparando la condición con MG132 con la condición control (**Fig. 4.16 C**, gráficas superior representa las condiciones con HDAC6wt y la inferior con la fracción BUZ). Aunque en la célula existe un procesamiento basal de componentes celulares vía autofagia, este proceso puede fomentarse bajo determinadas circunstancias. Una de las condiciones que activan la autofagia es la acumulación de proteínas sin degradar debido al bloqueo del proteasoma. Por ello, al degradarse Vif a través de mecanismos autofágicos y al estar estos mecanismos aumentados en presencia de MG132, nos encontramos mayores niveles de degradación de Vif en comparación con la condición control.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

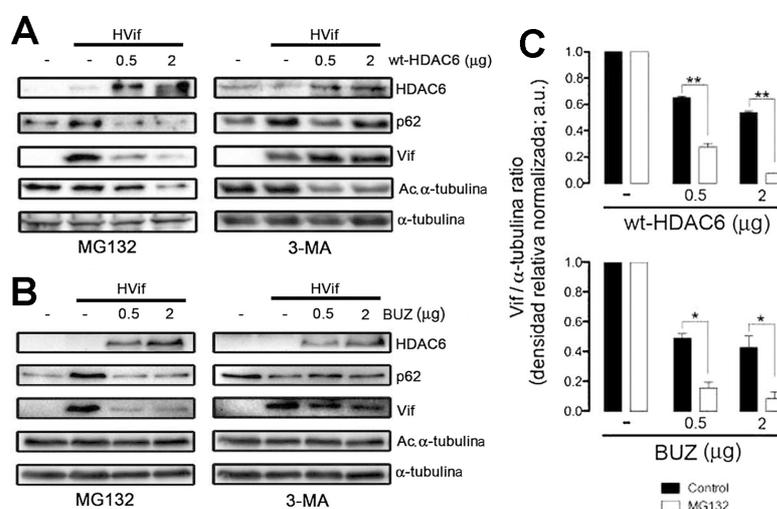


Figura 4.16: Estudio de la inhibición del proteasoma y de la autofagia. A) Ensayos con el constructo HDAC6wt durante la inhibición del proteasoma con MG132 (imagen izquierda) y la inhibición de la autofagia (imagen derecha). B) Ensayos con el constructo BUZ durante la inhibición del proteasoma con MG132 (imagen izquierda) y la inhibición de la autofagia (imagen derecha). C) Gráficas que representan las señales de Vif de las condiciones control (barras negras) y las condiciones de inhibición del proteasoma (barras blancas) donde se muestra la potenciación de la degradación de Vif por el bloqueo del proteasoma (comparación entre barras blancas y negras), tanto en presencia de HDAC6wt (gráfica superior) como en presencia de la fracción BUZ (gráfica inferior).

#### 4.1.11 HDAC6 afecta a la infectividad de VIH

La última cuestión que nos planteamos en la caracterización de HDAC6 como factor antiviral contra Vif, fue estudiar cómo afecta la actividad de HDAC6 en la capacidad infectiva del VIH. Llevamos a cabo la síntesis de pseudovirus en células 293T realizando co-transfecciones de plásmido codificante de cuerpo viral (1 μg) junto con plásmido codificante de las proteínas de la envuelta (1 μg), además, se añadió el plásmido que codifica para A3G-3xHA en todas las condiciones (0,5 μg, las células 293T son permisivas, no expresan A3G de manera endógena). Además, según la condición se co-transfectó plásmido HDAC6wt (de 0,5 μg y 1 μg) o plásmido HDAC6-ΔBUZ (0,5 μg y 1 μg). Los pseudovirus presentes en el sobrenadante del cultivo de 293T fueron usados para infectar células HeLa P5, que

presentan el gen de la enzima  $\beta$ -Galactosidasa bajo la regulación de la proteína viral Tat. La infección de estas células provoca la expresión de esta enzima, cuya presencia se detecta por su actividad y la representamos como unidades relativas de luz. Los pseudovirus sintetizados en presencia de HDAC6wt presentaron unos niveles de infección mucho menores que los de la condición control (**Fig. 4.17 A**, condiciones 2 y 3 en comparación con la condición 1). Además, este descenso en la capacidad infectiva es proporcional a la cantidad de HDAC6 sobre-expresado. En cambio, la producción de pseudovirus en presencia de HDAC6- $\Delta$ BUZ no parece conducir a una pérdida en la capacidad infectiva de estos pseudovirus (**Fig. 4.17 A**, las condiciones 4 y 5 en comparación con la condición 1)

En sintonía con el experimento anterior realizamos una producción de pseudovirus en células 293T donde en vez de provocar una sobre-expresión de HDAC6, silenciamos la proteína endógena mediante el uso de ARNi. Los niveles de luz producidos por estos pseudovirus sintetizados en condiciones de baja expresión de HDAC6 resultaron mucho más elevados que los de la condición control *scrambled* (**Fig. 4.17 B**).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## RESULTADOS

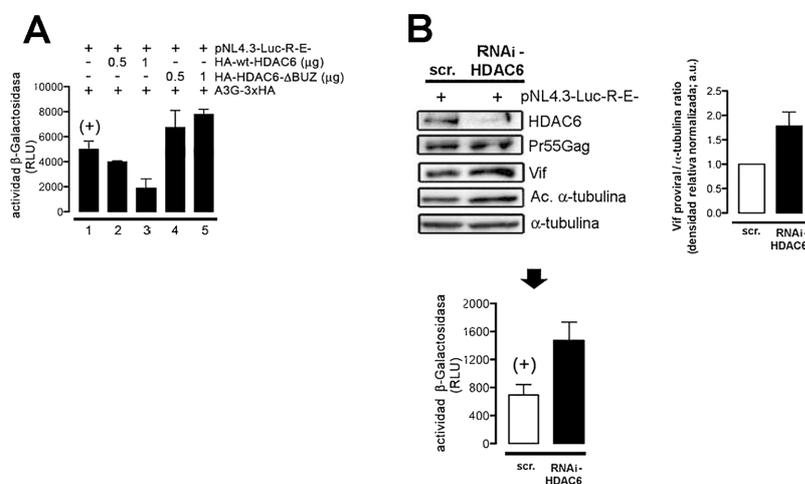


Figura 4.17: Ensayos de infección por el método de la  $\beta$ -Galactosidasa en células HeLaP5.

Las condiciones representadas corresponden a las de las células 293T productoras. Las condiciones 2 y 3 corresponden a entornos de producción de pseudovirus en presencia de HDAC6wt en cantidades crecientes y las condiciones 4 y 5 corresponden a entornos de producción de pseudovirus en presencia de HDAC6- $\Delta$ BUZ. Los valores representados son los valores de emisión sin normalizar. B) Ensayo de infección donde la producción de pseudovirus se dió bajo un silenciamiento de la proteína HDAC6 endógena en comparación con la producción de pseudovirus en condiciones normales, se graficaron los valores absolutos (gráfica inferior). La imagen de Western Blot adjunta corresponde a los lisados celulares de las células 293T productoras de pseudovirus. Se muestra además, la representación del aumento de la señal de la proteína Vif debido al silenciamiento de HDAC6 en las células productoras (gráfica derecha).

La disminución de la capacidad infectiva en los pseudovirus producidos en presencia de HDAC6 podría explicarse por el fenómeno de degradación de Vif y consecuente protección de A3G. Al haber menos Vif en la célula productora A3G no será degradado por la acción de Vif y podrá encapsidarse dentro del virión y actuar en su rol de factor de restricción en los siguientes ciclos de infección, disminuyendo la infectividad de los pseudovirus. Para comprobar esta hipótesis realizamos de nuevo ensayos de infección comprobando la presencia de A3G dentro de las partículas víricas. La producción de pseudovirus se hizo en células 293T con mismas condiciones que en experimentos anteriores, a diferencia que el

plásmido usado para la síntesis de las proteínas de la envuelta presentaban tropismo X4. De esta manera, además, nos aseguramos que el efecto observado no guarda relación con el tropismo del virus. También, previo a realizar el ensayo de infección, en este caso realizado en células CEM-NK<sup>R</sup>-CCR5, separamos una fracción del sobrenadante para analizar los pseudovirus ahí presentes. Tras provocar la desnaturalización de las partículas víricas y aislamiento de las proteínas, sometimos esta fracción a un análisis por *Western Blot*. Y detectamos las proteínas Vif y A3G ahí presentes. En las condiciones donde hay sobre-expresión de HDAC6wt la encapsidación de Vif fue menos exitosa que en el resto de las condiciones (**Fig. 4.18**, imagen “lisado de virus”, comparando condiciones 3 y 4 con condición 2) lo que parece traducirse en una menor infección según vemos en la gráfica adjunta. En cambio la presencia de HDAC6-ΔBUZ durante la producción de pseudovirus no pareció afectar a la encapsidación de Vif. En todas las condiciones la presencia de A3G dentro del virión fue estable. Ante estos resultados concluimos que la presencia de HDAC6wt, vía autofagia, promueve la degradación de Vif y en consecuencia A3G no es degradado, se encapsidará dentro del virión y actuará en los siguientes ciclos mermando significativamente la capacidad de infección del virus. En cambio, en presencia de HDAC6-ΔBUZ, Vif no es degradado, y aunque A3G tampoco resulta degradado, permanece marcado con cadenas de ubiquitinas para su degradación proteasómica. A pesar de encapsidarse en las partículas nacientes, este A3G no conserva su funcionalidad y no afecta a la capacidad infecciosa de los pseudovirus. Es posible que este marcaje de Ubiquitinas provoque cambios conformacionales que inactiven la capacidad enzimática o de reconocimiento de la cadena *minus* del ADN viral o que al entrar en la nueva célula junto con el virus, sea diana de la maquinaria proteasómica de degradación de esta nueva célula.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

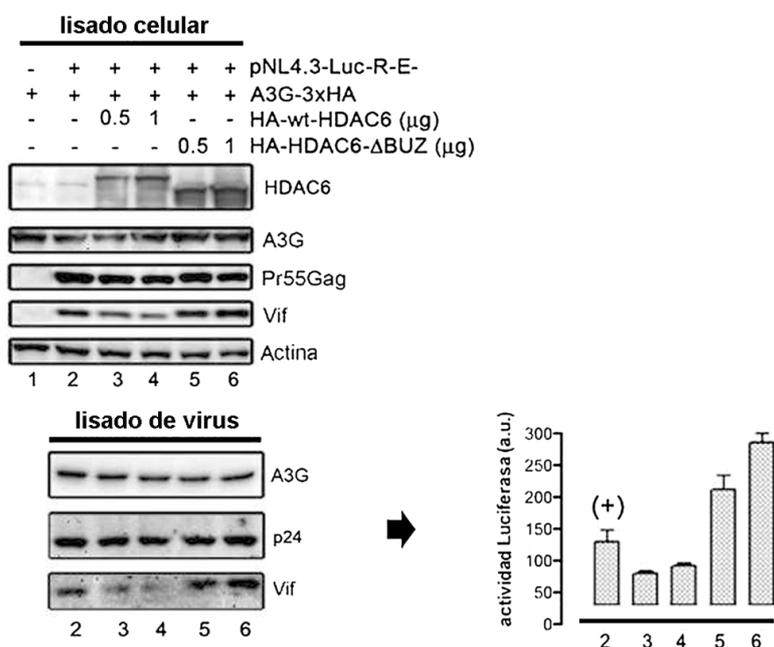


Figura 4.18: Ensayo de infección por el método de la enzima Luciferasa en CEM.NK<sup>6</sup>-CCR5.

Ensayo de infección en condiciones de sobre-expresión de HDAC6wt (condiciones 3 y 4) y de sobre-expresión de HDAC6-ΔBUZ (condiciones 5 y 6). Se muestra la imagen representativa de Western Blot de los lisados celulares de las células productoras de pseudovirus (imagen superior), la imagen representativa de Western Blot de los lisados de las partículas virales presentes en los sobrenadantes de las células productoras (imagen inferior) y una representación gráfica de los valores absolutos de luz resultado del ensayo de infección.

## 4.2 HDAC6 afecta a la producción de las partículas virales mediante la desestabilización de la proteína Pr55-Gag

### 4.2.1 HDAC6 modula negativamente la estabilidad de la proteína Pr55-Gag.

El segundo gran objetivo de este trabajo en el marco de caracterizar el posible efecto negativo de HDAC6 sobre el VIH, se centra en estudiar si HDAC6 es capaz de provocar la inestabilidad de la proteína estructural Pr55-Gag (llamada a partir de ahora Gag). Gag es una poliproteína que, tras su procesamiento, da lugar a las moléculas que componen las principales estructuras del virus, proteína Matriz, Cápside, Nucleocápside etc. Durante las fases de producción y síntesis del virus, esta proteína sufre varias modificaciones post-traduccionales, resultando de nuestro interés la ubiquitinación de su región C terminal. Además, presenta una tendencia a localizarse en regiones concretas, formando aparentes agregados dentro de la célula. En base a estos dos aspectos, basamos nuestra hipótesis la cual propone que HDAC6 podría detectar estos “agregados” de Gag poli-ubiquitinados y promover su consecuente degradación.

Comenzamos con el estudio de este posible efecto de HDAC6 sobre Gag realizando la co-expresión de ambas proteínas en células 293T y posteriormente ensayos bioquímicos de *Western Blot*. Como fuente de Gag empleamos el plásmido proviral pNL4-3.Luc.RE<sup>-</sup> (1 µg de plásmido por condición), que excepto las proteínas de la envuelta y Nef, expresa todas las proteínas virales dándonos un contexto viral óptimo y seguro en nuestras condiciones de trabajo. Para expresar HDAC6 empleamos el plásmido HA-wtHDAC6 (dos condiciones de 0,5 µg y 2 µg de plásmido). Los resultados de nuestros experimentos nos indican que se produciría un entorno de inestabilidad de Gag en presencia de HDAC6. Además, este efecto observado es dependiente de la dosis o cantidad de HDAC6 que se ha expresado

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

(Fig. 4.19, comparando los carriles 2 y 3 con el carril 1). En la gráfica donde representamos las medias de intensidad de varios experimentos para las señales de proteína Gag, se evidencia más claramente el efecto mostrado en los *Western Blot*. El análisis estadístico de los resultados nos mostró como significativo este descenso de la señal de la proteína. El marcaje de  $\alpha$ -Tubulina acetilada, al igual que en el resto del trabajo, nos sirve como un control interno de la funcionalidad de HDAC6 recombinante expresada en la célula a partir de nuestro plásmido.

Al igual que en el apartado anterior detectamos HDAC6 mediante un anticuerpo específico y para la detección de la proteína viral Gag, también usamos un anticuerpo específico que marca su forma de proteína entera, sin procesar, de 55 KDa.

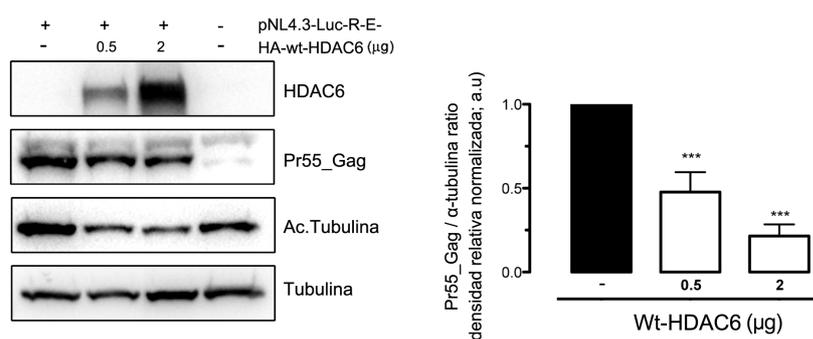


Figura 4.19: Estudio bioquímico del efecto pro-degradativo de Gag en presencia de HDAC6. Imagen de Western Blot representativa acompañada por la gráfica representativa de los valores de la señal de Gag tomando como control la señal de la proteína expresada en ausencia de HDAC6 y normalizando el resto de valores con respecto a ella.

#### 4.2.2 HDAC6 no afecta a la infectividad del VIH como consecuencia de la inestabilidad de Pr55-Gag.

Tras observar la afectación de Gag debido a la presencia de HDAC6 en los ensayos de bioquímica, quisimos analizar si este efecto podría modular la

infectividad de estos virus. Para ello realizamos ensayos de infección en los que a partir de la co-transfección de 1 µg de cada uno de los plásmidos, pNL4-3.Luc.R<sup>E</sup> (codifica para el cuerpo viral) y pSF162-gp160 (codifica para la proteína de la envuelta), obtuvimos pseudovirus con tropismo R5. Añadimos dos condiciones plásmido codificante para HA-HDAC6wt (0,5 µg y 2 µg) en células 293T. Recordemos que las células 293T son células permisivas, que carecen de la proteína A3G, y este entorno es útil para evitar el efecto de disminución de la infectividad debido a la degradación de Vif y protección A3G. De cada punto experimental (condición control de producción de pseudovirus, y las dos condiciones de pseudovirus producidos en presencia de cantidades crecientes de HDAC6), recogimos volúmenes iguales de los sobrenadantes que fueron usados para infectar células CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5. Este ensayo de infección basado en la actividad de la enzima Luciferasa se basa en que una infección exitosa de las CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5 lleva a la expresión de Luciferasa que se encuentra codificada en el genoma de los pseudovirus. Tras añadir el sustrato correspondiente medimos la cantidad de luz generada, por lo que, a mayor capacidad infectiva registraremos mayores cantidades de unidades de luz.

La infección de las CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5 con los pseudovirus producidos en presencia de HDAC6 parecía ser menos efectiva en comparación con la condición control según nos indica la gráfica de la **Fig. 4.20 A**. Además, esta pérdida de capacidad infectiva correlaciona negativamente con el aumento de la expresión de HDAC6, pero como hemos indicado, este aparente descenso de la infectividad en presencia de HDAC6 no podía explicarse por la acción de A3G. A diferencia de los ensayos de infección realizados en el apartado anterior, en esta ocasión usamos volúmenes iguales de cada sobrenadante para infectar las células, así que nos planteamos si este aparente descenso de la capacidad infectiva era real o un

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

resultado artefactado debido a una menor presencia de pseudovirus en los sobrenadantes. Para discernir entre estas dos posibles opciones, realizamos la cuantificación mediante ELISA de p24 presente en los sobrenadantes (proteína de la cápside del virus, CA). Los resultados de estos ensayos nos indican que la presencia de HDAC6 se ve acompañada por una disminución de la cantidad de pseudovirus liberados al medio (Fig. 4.20 B). Concluimos que la aparente menor infectividad de los pseudovirus es el resultado de una menor concentración de los mismos en el sobrenadante de las células productoras (Fig. 4.20 B). Un ratio normalizador entre los valores de infección y los de p24 refleja que efectivamente la presencia de HDAC6 no parece afectar, en este caso, a la infectividad de los virus.

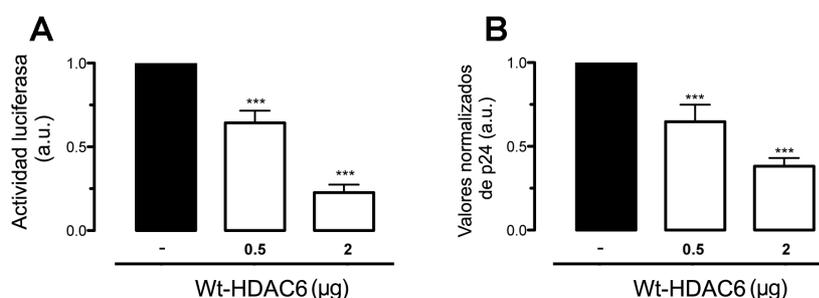


Figura 4.20: Ensayo de infección por el método de la Luciferasa en CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5. Los pseudovirus fueron producidos bajo condiciones de sobre-expresión creciente de HDAC6wt. A) Gráfica de los valores de luz obtenidos a consecuencia de la actividad de la Luciferasa, medida indirecta de una infección exitosa. Se tomó como referencia el valor de la condición sin HDAC6 y se normalizó el resto de resultados en base a él. B) Gráfica de los valores de p24 de los sobrenadantes, tomando como valor de referencia el obtenido para el sobrenadante de las células sin HDAC6 recombinante y se normalizaron el resto de valores en base a él.

#### 4.2.3 HDAC6 afecta a la localización en agregados de Pr55-Gag en la célula.

Cuando la proteína Gag es expresada en el citoplasma celular tiende a formar pequeños agregados, principalmente asociados a membrana. Este fenómeno podemos observarlo mediante microscopía confocal en células 293T

donde previamente transfectamos un plásmido codificante para esta proteína acoplada a la proteína verde fluorescente (GFP). Nos planteamos si HDAC6 podría no solo promover la inestabilidad de la proteína si no también afectar a la formación de estos agregados. Para ello, planteamos ensayos de microscopía confocal en los cuales co-transfectamos en células 293T los plásmidos Gag-GFP (1  $\mu$ g) y HDAC6wt (2  $\mu$ g) y observamos cómo el patrón punteado de Gag se ve modificado.

Previamente a la realización de estos experimentos, realizamos unos ensayos control para verificar que esta proteína Gag expresada en solitario, acoplada a GFP era también sensible a la presencia de HDAC6. Realizamos ensayos de transfección en células 293T y análisis por *Western Blot*, al igual que cuando abordamos este aspecto con la proteína Gag proveniente de un entorno viral más completo. Podíamos temer que la presencia de la etiqueta GFP o la ausencia de la proteasa viral, o de otros componentes víricos, pudiese afectar al efecto observado en experimentos anteriores. En la imagen representativa de *Western Blot* y la gráfica adjunta de varios experimentos de la **Fig. 4.21** observamos que HDAC6, también en este caso, resulta pro-degradativo de Gag, de manera proporcional a la cantidad de HDAC6 en la célula. Usamos para detectar este Gag el mismo anticuerpo que en los experimentos anteriores.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## RESULTADOS

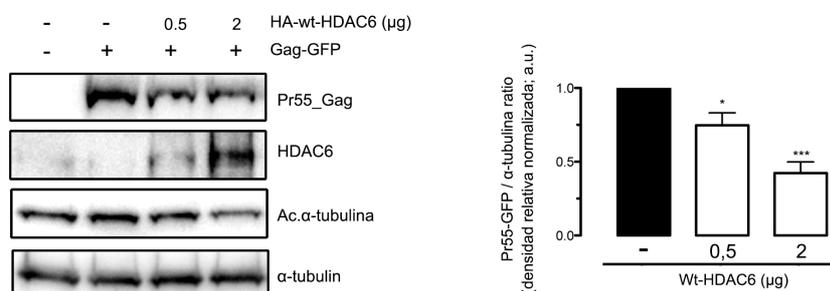


Figura 4.21: Ensayo control del efecto de HDAC6 sobre Gag-GFP.

Imagen representativa de Western Blot acompañada de la gráfica donde están representados los valores de la señal de Gag-GFP, tomando como control la señal de la proteína expresada en ausencia de HDAC6 y normalizando el resto de valores por dicho valor.

Una vez comprobado que el *tag* de Gag y la ausencia del resto de componentes virales, no afectaba al efecto de HDAC6 sobre esta proteína viral realizamos los ensayos de microscopía confocal. La proteína Gag se observa por la fluorescencia propia de su *tag* GFP y para visualizar HDAC6 y α-Tubulina en microscopía confocal usamos anticuerpos primarios específicos para cada proteína y secundarios con fluoróforos acoplados (Alexa-633 para HDAC6 y Alexa-568 para Tubulina). Al expresar el plásmido Gag-GFP observamos un patrón punteado en la célula que refleja la presencia de pequeños agregados de Gag (**Fig. 4.22 A**, set de imágenes superior, condición Gag-GFP). En la condición de co-transfección con HDAC6wt el patrón punteado disminuye considerablemente, llegando incluso a desaparecer (**Fig. 4.22 B**, set de imágenes inferiores, condición Gag-GFP). Con las imágenes de los experimentos realizamos dos tipos de análisis, en primer lugar, cuantificamos las intensidades de todas las células verdes de los campos analizados, tanto en la condición control como en la condición donde se estaba sobre-expresando HDAC6. Además, en cada campo calculamos el porcentaje de patrón punteado de las células verdes. Los resultados de estos análisis nos revelaron una disminución significativa de la media de fluorescencia verde de las

células donde hay expresión de HDAC6 con respecto al control (Fig. 4.22 C, gráfica izquierda). En segundo lugar, hay una significativa bajada del porcentaje de células con agregados de Gag debido a la presencia de HDAC6 (Fig. 4.22 C, gráfica derecha). Concluimos que HDAC6 afecta significativamente a la distribución de Gag en agregados dentro de la célula, lo que podría llevar a una pérdida de la eficiencia en la formación y liberación de nuevas partículas virales.

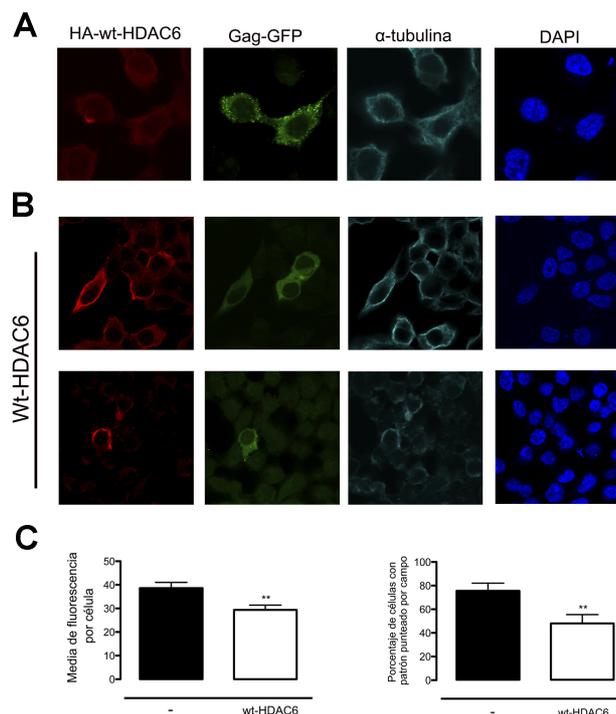


Figura 4.22: Estudio del patrón de agregación de Gag.

A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células 293T en las que se transfeció el plásmido Gag-GFP. Se marcó el HDAC6 endógeno (rojo) y la Tubulina (azul), Gag se observa (verde) por la fluorescencia de su tag. B) Experimento donde se co-transfectaron los plásmidos Gag-GFP y HDAC6. Se marcó HDAC6 total, sin distinción entre proteína endógena o recombinante. C) Gráficas de los resultados de los análisis de las imágenes de microscopía confocal. Representan las medias de intensidad de señal verde/GFP de las células en ambas condiciones (gráfica izquierda) y el porcentaje de células verdes/GFP<sup>+</sup> con patrón punteado en ambas condiciones (gráfica derecha).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

#### 4.2.4 La actividad desacetilasa de HDAC6 es indispensable para su efecto pro-degradativo de Pr55-Gag.

La siguiente cuestión que abordamos fue tratar de determinar cuál de los dominios de HDAC6 podía estar implicado en esta degradación de Gag. El abordaje experimental de dicha cuestión fue idéntico al desarrollado en objetivos anteriores. Realizamos ensayos de co-transfección en células 293T y posteriormente por análisis bioquímicos de *Western Blot* analizamos la cantidad de proteína Gag presente en el lisado celular. Nuevamente transfectamos 1  $\mu\text{g}$  de plásmido pNL4.3-Luc-R-E- como fuente de Gag y 0,5  $\mu\text{g}$  y 2  $\mu\text{g}$  de los plásmidos HDAC6- $\Delta$ BUZ, HDAC6-BUZ y HDAC6dm, para la expresión de un mutante de HDAC6 con la región BUZ delecionada, sólo la región BUZ o un mutante sin actividad desacetilasa, respectivamente.

La **Fig. 4.23** la componen imágenes de *Western Blot* representativas de estos experimentos acompañadas de las gráficas de cuantificación de Gag de todos los experimentos realizados. Aparentemente, y según las imágenes de *Western Blot*, las señales de Gag en los casos donde se han co-transfectado los plásmidos HDAC6- $\Delta$ BUZ y HDAC6dm no parecen disminuir con respecto al control. En cambio, vemos que la co-transfección del fragmento BUZ sí promueve una disminución de la señal de Gag de manera proporcional a la cantidad de plásmido transfectado, mimetizando el efecto observado con la proteína HDAC6 salvaje, al igual que sucedía con la degradación de Vif. El marcaje de  $\alpha$ -Tubulina acetilada en esta ocasión nos permite comprobar como tanto en el experimento con HDAC6-BUZ, como con HDAC6dm, no se produce una disminución de la  $\alpha$ -Tubulina acetilada, lo que nos sirve como un control interno, ya que en el primer caso los dominios responsables de la actividad desacetilasa de HDAC6 están ausentes y en el segundo caso dichos dominios son inactivos.

A pesar de estos resultados aparentes, la representación gráfica adjunta de los valores de señal de Gag de todos los experimentos realizados nos confirman lo que visualmente vemos en el caso de HDAC6-BUZ y HDAC6dm, una disminución significativa de Gag y una variación no significativa respectivamente. En cambio, al representar los resultados de los experimentos realizados con HDAC6- $\Delta$ BUZ, estadísticamente, la pequeña variación en la señal de Gag sí resulta significativa. En base a estos resultados, solamente podríamos afirmar que para la degradación de la proteína Gag promovida por la presencia de HDAC6 resulta indispensable la actividad desacetilasa de esta proteína. En cambio, nuestra hipótesis sigue siendo que el reconocimiento de Gag por parte de HDAC6 es gracias a la ubiquitinación de la proteína viral, por lo que cabría esperar que la pérdida del dominio BUZ lleve a una pérdida en el fenotipo de degradación de Gag. Este aspecto y la concordancia de estos resultados con respecto a nuestra hipótesis será discutida en la siguiente sección de esta tesis, en el apartado Discusión.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

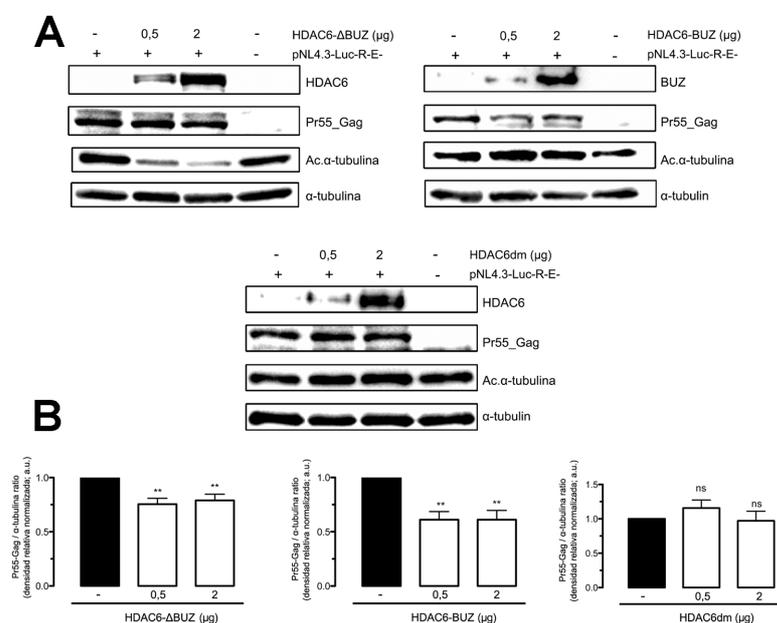


Figura 4.23: Implicación de los dominios de HDAC6 en el efecto pro-degradativo sobre Gag.  
 A) Imágenes representativas de los ensayos bioquímicos donde enfrentamos la expresión de Gag a tres mutantes de HDAC6, en el sentido habitual de lectura: HDAC6-ΔBUZ, HDAC6-BUZ y HDAC6dm. B) Cuantificación de las señales de proteína Gag de los ensayos de bioquímica. El valor usado como referencia fue el obtenido en la cuantificación de la señal de Gag en ausencia de sobre-expresión de HDAC6.

#### 4.2.5 La autofagia es la vía degradativa a través de la cual HDAC6 promueve la degradación de Pr55-Gag.

Luego de los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo, donde se concluía que HDAC6 inducía la degradación de Vif mediante la ruta autofágica, además de los datos en la bibliografía que nos hablan de su gran implicación en esta ruta, nos tomamos la libertad de presuponer que HDAC6 podría inducir la degradación de Gag introduciéndolo en las rutas de degradación de la autofagia. A pesar de ello, y para no errar en nuestras conclusiones, decidimos también

estudiar en nuestro abordaje experimental, la degradación a través del proteasoma.

De manera estandarizada en los estudios sobre la autofagia se utilizan como monitores del proceso las proteínas LC3 o p62. Tanto en la autofagia basal como en la autofagia activada, se produce la adición de un grupo fosfatidiletanolamina (PE, *phosphatidylethanolamine*) en la proteína LC3 (LC3-I), permitiendo la unión de esta proteína a la membrana de las vesículas autofágicas y apareciendo así una nueva forma de LC3 (LC3-II). Esta nueva forma asociada a las vesículas es degradada en el procesamiento de las mismas tras la fusión con el lisosoma. Además, también se produce la degradación de la proteína p62, miembro importante de la autofagia y que también se encuentra asociada a las vesículas autofágicas. Por lo tanto, la acumulación o disminución de alguna de ellas nos puede indicar la activación o bloqueo del proceso. El obstáculo se encuentra en el hecho de que, al ser un proceso altamente dinámico, diferentes estados del fenómeno pueden mostrarnos similares resultados bioquímicos: tanto un bloqueo de la autofagia como una activación de la misma nos pueden llevar a observar un aumento de la señal de LC3-II (en el primer caso porque la proteína se produce pero no está siendo degradada, y en el segundo caso porque aunque sí está siendo degradada se produce en demasía). Además, cada tipo celular presenta una expresión basal y un reciclado de las proteínas diferente. Por todo ello consideramos usar ambas proteínas como control del bloqueo del proceso y decidimos caracterizar la expresión y dinámica de ellas en nuestra línea celular. En células 293T en cultivo, fomentamos el proceso de autofagia provocando un bloqueo del proteasoma (con una incubación con MG132 durante 3,5 horas), para posteriormente añadir 3-MA como inhibidor de la autofagia durante un tiempo variable (2, 3 y 5 horas). También añadimos 3-MA en células sin tratar para

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

observar el comportamiento de estas proteínas frente a un bloqueo de la autofagia basal.

La imagen de *Western Blot* de la **Fig.a 4.24** nos muestra el resultado de la caracterización. Comparando las condiciones control y MG132 (carriles 1 y 2, respectivamente) vemos la respuesta esperada tanto de p62 como de LC3 al activar la autofagia, es decir, un decremento de la señal de la primera proteína y un aumento de la banda de LC3-II (banda inferior del marcaje LC3). En los carriles siguientes vemos una recuperación progresiva de las señales de p62 dependiente del tiempo de bloqueo y aunque en las primeras tres horas la señal de LC3-II no varía, si existe un aumento de la señal a las cinco horas del bloqueo de la autofagia tras haberla activado. Entendimos que este aumento o recuperación de la señal es debido no a una mayor expresión de las proteínas si no a una menor tasa de degradación. Con respecto a la autofagia basal (últimos tres carriles), hay una respuesta temprana de acumulación de p62 (evidente ya a las dos horas de tratamiento con 3-MA) y un aumento más progresivo de la señal de LC3-II.

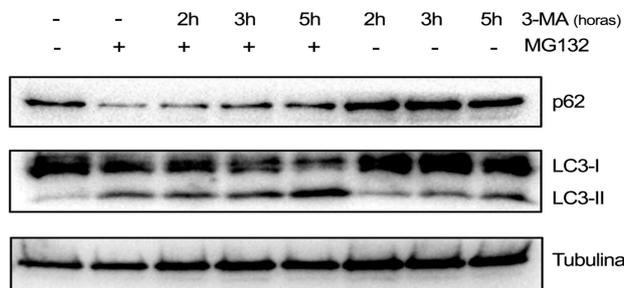


Figura 4.24: Caracterización de la respuesta de p62 y LC3 (I y II) a un bloqueo de la autofagia post-activación o basal en células 293T.

En base a estos resultados establecimos que en nuestras condiciones de trabajo y en células 293T, entre tres y cinco horas tras añadir un inhibidor de la

autofagia obtendríamos un aumento de la señal de LC3-II acompañado por un aumento de la señal de p62 lo que nos indicaría un bloqueo exitoso del proceso.

Establecidas nuestros controles y condiciones, realizamos nuevamente ensayos de co-transfección idénticos que los realizados en la **Fig. 4.19**, co-transfectando 1  $\mu\text{g}$  de pNL4-3.Luc.R<sup>E</sup> en todas las condiciones y cantidades crecientes de HA-wtHDAC6 (0,5  $\mu\text{g}$  y 2  $\mu\text{g}$ ). Cinco horas antes de realizar la lisis de las células se añadieron los inhibidores del proteasoma y de la autofagia. Nuevamente, usamos MG132 para provocar el bloqueo del proteasoma y 3-MA para bloquear la autofagia. 3-MA bloquea la formación de autofagosomas, a través de la inhibición de Pi-3K III (fosfatidilinositol 3 quinasa de clase III) afectando a la vía de activación mediante AKT y el complejo mTOR, es decir que inhibe la autofagia en fases tempranas del proceso. Debido a la complejidad de esta ruta degradativa, a las diferentes vías de activación, y la gran dinámica de membrana que la componen, que originan rutas alternativas, decidimos emplear además, un inhibidor de la autofagia en fases tardías del proceso. Nos decantamos por la Bafilomicina A, un inhibidor de la bomba de protones que impide la acidificación de los lisosomas y bloquea tanto la fusión de las vesículas autofágicas con los lisosomas, como el evento final de activación de las proteasas dependientes de pH ácido, que se encargan del procesamiento de los componentes de dichas vesículas.

El objetivo de estos experimentos se basa en estudiar si la señal de Gag por *Western Blot* en las condiciones de co-transfección con HDAC6, mantienen el mismo patrón que el obtenido en la condición control a pesar del bloqueo del proteasoma o autofagia. Podemos observar en las gráficas de la intensidad de Gag, de las medias de varios experimentos, que no existen cambios en la variación de la señal en las muestras donde el proteasoma se ha inhibido por la adición de MG132 con respecto a la condición control (**Fig. 4.25**, gráficas superiores). En ambos casos

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

observamos, al igual que en la **Fig. 4.19**, una disminución de la señal de intensidad de Gag debido a la expresión cada vez mayor de HDAC6 en la célula. Incluso parece verse aumentada la degradación de Gag debido a la presencia de HDAC6 al bloquearse la ruta proteasómica (comparando la barra de intensidad de Gag de la condición “0,5 µg de HDAC6” de la gráfica MG132 con respecto a la misma barra de la gráfica control (DMSO)). En cambio, al bloquear la autofagia, tanto inhibiendo la ruta en los eventos más iniciales como en las últimas fases del proceso, observamos que la señal de Gag no se ve afectada por la expresión de HDAC6 en ninguna de las condiciones experimentales, resultando no significativas las pequeñas diferencias observadas (**Fig. 4.25**, gráficas inferiores).

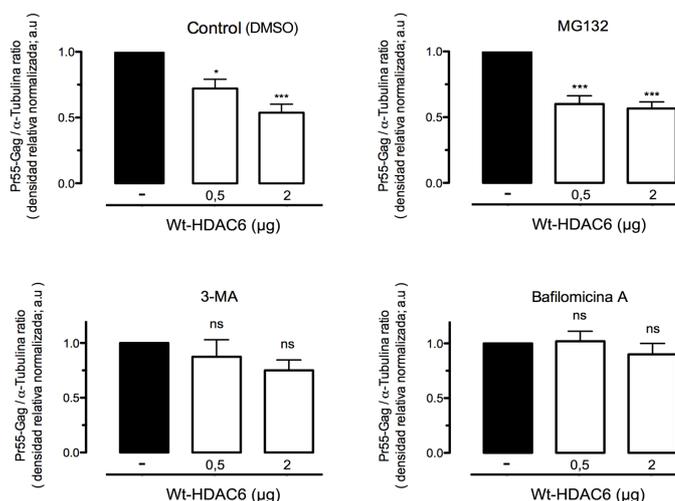


Figura 4.25: Estudio de la respuesta pro-degradativa de HDAC6 sobre Gag en condiciones de bloqueo del proteasoma y la autofagia.

Las gráficas que se muestran corresponden a las cuantificaciones de señal de Gag de los ensayos de bioquímica realizados. Se tomó como valor de referencia en cada caso la señal de Gag en ausencia de HDAC6 y en presencia del inhibidor, y se normalizaron el resto de resultados en base a esa condición.

Imágenes representativas de este fenómeno las tenemos en la **Fig. 4.26**. En estos *Western Blot* podemos comparar visualmente la pérdida de señal de Gag por

la expresión aumentada de HDAC6 en los casos de condición control (los tres primeros carriles de cada imagen, muy evidente en la condición con 2 µg), con la estabilidad de la señal de la proteína en las condiciones donde hemos añadido 3-MA (del quinto al séptimo carril de la primera imagen) y Bafilomicina A (del quinto al séptimo carril de la segunda imagen). Como controles de la eficiencia de nuestros inhibidores acompañamos la imagen con el análisis bioquímico por *Western Blot* de las proteínas p62 y LC3-I y LC3-II. Se observa que debido al bloqueo de la autofagia basal obtenemos un aumento general de la señal de p62 y de LC3-II en los últimos cuatro carriles de cada imagen debido a la acumulación de estas proteínas.

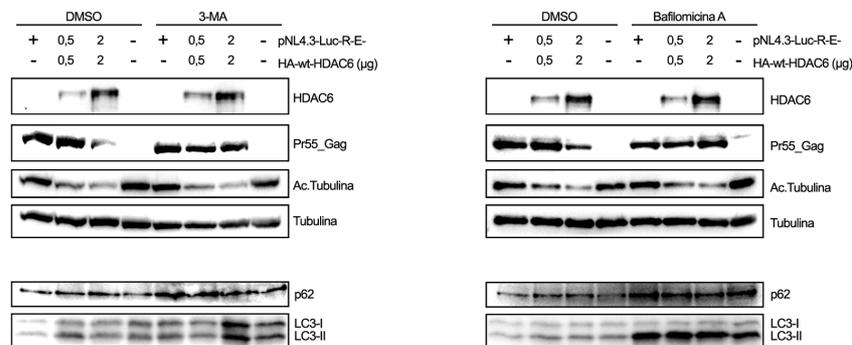


Figura 4.26: Estudio del bloqueo de la degradación de Gag promovida por HDAC6 por la paralización del proceso autofágico.

En ambas imágenes representativas de los ensayos se muestra la repuesta de Gag en unas condiciones control seguida con por las condiciones de bloqueo de la autofagia con 3-MA (imagen izquierda) y con Bafilomicina A (imagen derecha). Se muestra también la respuesta de las proteínas p62 y LC3 en las imágenes inferiores para cada caso.

#### 4.2.6 HDAC6 afecta a la estabilidad de Pr55-Gag procedente de un provirus pNL4.3

En las etapas finales de este trabajo surgió la oportunidad de trabajar en un laboratorio de contención biológica de nivel 3 (BL3) en Badalona. Por ello,

decidimos aprovechar dicha oportunidad y verificar nuestros resultados en un contexto viral completo. Repetimos nuestros experimentos de estudio de la degradación de Gag mediante transfección en células 293T con posterior análisis bioquímico por *Western Blot*, pero en esta ocasión usando el plásmido del provirus pNL4.3, el cual codifica para un virus VIH completo, con todos sus componentes y por lo tanto infeccioso. Como fuente de HDAC6 usamos los mismos plásmidos que en los experimentos anteriores y en las mismas cantidades (0,5 µg y 2 µg de HDAC6wt, HDAC6-ΔBUZ, HDAC6dm).

La **Fig. 4.27** nos muestra una imagen de *Western Blot* representativa del experimento, con la gráfica de cuantificación de la señal de Gag adjunta. La degradación de Gag promovida por HDAC6wt se reproduce igual que en experimentos anteriores. Confirmamos así este efecto en un contexto idéntico al de una infección por VIH en la célula. Con respecto al efecto producido por la expresión de HDAC6-ΔBUZ y HDAC6dm, obtenemos una variación no significativa entre la señal de Gag control y la de las condiciones experimentales. Por lo que en este caso afirmamos que tanto el dominio BUZ como la actividad desacetilasa de HDAC6 son indispensables para su acción anti-VIH.

La aparente contradicción entre los resultados obtenidos en estos experimentos con respecto a los obtenidos en **Fig. 4.23** en las condiciones con HDAC6-ΔBUZ serán debatidos en el siguiente apartado, en la Discusión.

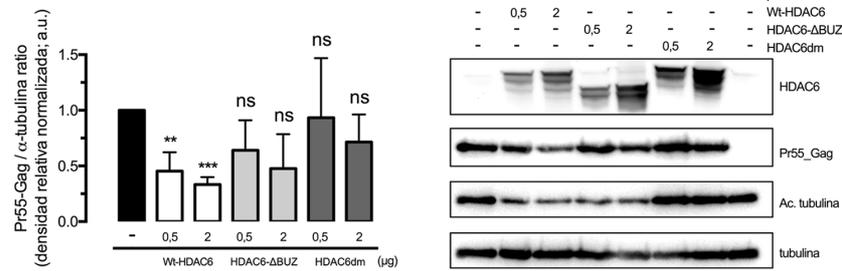


Figura 4.27: Caracterización de la acción de afectación de Gag de HDAC6 de un provirus. Cuantificación e imagen representativa de los ensayos bioquímicos realizados de la acción de HDAC6 y sus mutantes sobre la proteína Gag proveniente de un provirus. El valor tomado como referencia fue el de la señal de Gag en ausencia de HDAC6.

Aprovechando los sobrenadantes de los experimentos anteriores realizamos ensayos de infección en células HeLa TZM-bl. El resultado de estos ensayos nos da un parámetro de infectividad que es la TCID50/mL. Este valor, que es el resultado de una titulación, nos indica la cantidad de virus necesaria para conseguir la infección del 50% de las células de nuestro cultivo: a mayor capacidad de infección, menor será la dosis de virus requerida. En el análisis de nuestros resultados normalizamos, como hemos hecho a lo largo de todo el trabajo, en relación a 1, siendo 1 el valor que tiene la condición control de nuestro virus. Aparentemente, observando la representación de la TCID50/mL, en todas las condiciones en presencia de HDAC6, tanto la variante salvaje como sus mutantes, conllevan a una disminución de la capacidad infecciosa con respecto a la condición control (Fig. 4.28 A, gráfica izquierda). En la realización de este ensayo, al tratarse de una titulación, se ha de partir de un mismo volumen de sobrenadante por lo que realizamos en momentos posteriores al ensayo de infección, la cuantificación de p24 mediante ELISA. El resultado es una gráfica con un patrón de variación similar al obtenido con los valores de TCID50/mL (Fig. 4.28 A, gráfica derecha). Debido a

estos resultados decidimos corregir los valores de infectividad por los valores de p24 de cada sobrenadante, y así facilitar el análisis de los resultados y eliminar la variable de la dosis de virus que llevaba a una incorrecta interpretación de los datos. Esta modificación dio lugar a la gráfica de la **Fig. 4.28 B**: podemos observar que las diferencias en infectividad observadas en las condiciones de expresión de HDAC6wt y HDAC6- $\Delta$ BUZ no son significativas con respecto al control, por lo que los virus sintetizados y liberados bajo estas condiciones no presentaban deficiencias en su función. Sorprendentemente, observamos que la producción de virus en presencia de HDAC6dm, aunque no parece afectar a la producción en cantidad de lo mismos, los virus resultantes presentan una capacidad de infección significativamente mermada con respecto a la condición control.

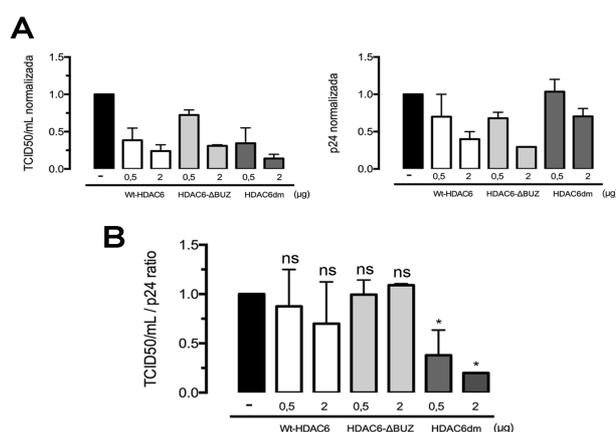


Figura 4.28: Ensayos de infección y ELISA de p24 de virus producidos en presencia de HDAC6. A) TCID50/mL de los virus producidos en presencia de HDAC6 (gráfica izquierda) y de la cuantificación de la p24 presente en los sobrenadantes (gráfica derecha). Los valores fueron normalizados por el valor de la condición sin HDAC6 sobre-expresado. B) Gráfica resultante de la corrección de los valores de TCID50/mL por el valor de p24 de cada condición. En la representación se tomó como valor de referencia el de la condición sin HDAC6.

#### 4.2.7 La ubiquitinación de la región p6 junto con otra de las regiones C terminal de Pr55-Gag resulta esencial para el reconocimiento por parte de HDAC6.

Como último aspecto a estudiar en este trabajo intentamos vislumbrar cuál o cuáles de las regiones ubiquitinables de Gag resultan determinantes para el reconocimiento por parte de HDAC6. Para ello, usamos una serie de plásmidos pNL4.3 los cuales presentan mutaciones de cambio de aminoácido de lisina a arginina en determinadas regiones de su extremo C terminal ya que las lisinas son los aminoácidos de una proteína susceptibles a ser ubiquitinados. En concreto se usaron siete plásmidos diferentes, pNC(KR), pSP2(KR), pp6(KR), pNCSP2(KR), pNCp6(KR), pSP2p6(KR) y pNCSP2p6(KR) cedidos amablemente por el Dr. HG. Kraüsslich (Heidelberg, Alemania). Las regiones mutadas son las regiones de la Nucleocápside (NC), del péptido espaciador 2 (SP2) y región p6 (p6) de manera individual o combinada. A pesar de presentar estas mutaciones en su gen *gag* la transfección de estos plásmidos en células produce la síntesis y liberación de virus infecciosos, por lo que estos experimentos también los realizamos bajo las condiciones de seguridad de un laboratorio de seguridad biológica de nivel 3. El motivo que nos llevó a probar estos mutantes del VIH fueron los trabajos previos del Dr. Kraüsslich que determinaron que la ubiquitinación de esas regiones parecían ser claves para una correcta salida y maduración viral. La mutación de una región era compensada por la ubiquitinación de alguna de las otras, pero las mutaciones que comprendían la región p6 en combinación o el mutante con todas las regiones no ubiquitinables resultaban ser los más defectivos en la salida y maduración. Repetimos los experimentos de co-transfección de los siete plásmidos codificantes para pNL4.3 (1 µg en cada experimento) junto con HDAC6wt en cantidades crecientes (0,5 µg y 2 µg en cada experimento).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

Los resultados se muestran en la **Fig. 4.29**, con una imagen de *Western Blot* representativa y las gráficas de cuantificación para cada mutante. Los tres primeros mutantes que presentan las regiones NC, SP2 y p6 mutadas de manera individual tienen un patrón de pérdida de señal de Gag muy similar entre sí y al obtenido en los experimentos con un Gagwt (**Fig. 4.27**, condiciones HDAC6wt). El siguiente mutante testado posee todas las lisinas de las regiones NC y SP2 mutadas, a pesar de ello, parece que la pérdida de ubiquitinación en ambas regiones en conjunto no afecta a la capacidad que presenta HDAC6 en reconocer y degradar a Gag. Finalmente, los 3 últimos mutantes usados, exhiben una aparente insensibilidad a la presencia de HDAC6, manteniéndose los niveles de señal Gag invariables o no significativamente modificados a pesar de la expresión de HDAC6 en la célula. Estos tres últimos mutantes presentan sus regiones p6 mutadas junto con alguna de las otras regiones (NC o SP2) o, como ocurre en el último caso todas las lisinas del extremo C terminal de la proteína mutadas, regiones NC, SP2 y p6. Esto nos lleva a concluir que cuando la región p6 junto con la región NC o SP2 no presentan modificación con ubiquitina, HDAC6 no logra reconocer a la proteína viral y encaminarla a su degradación mediante la maquinaria autofágica a pesar de que otras regiones de Gag sí presenten ubiquitininas covalentemente unidas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

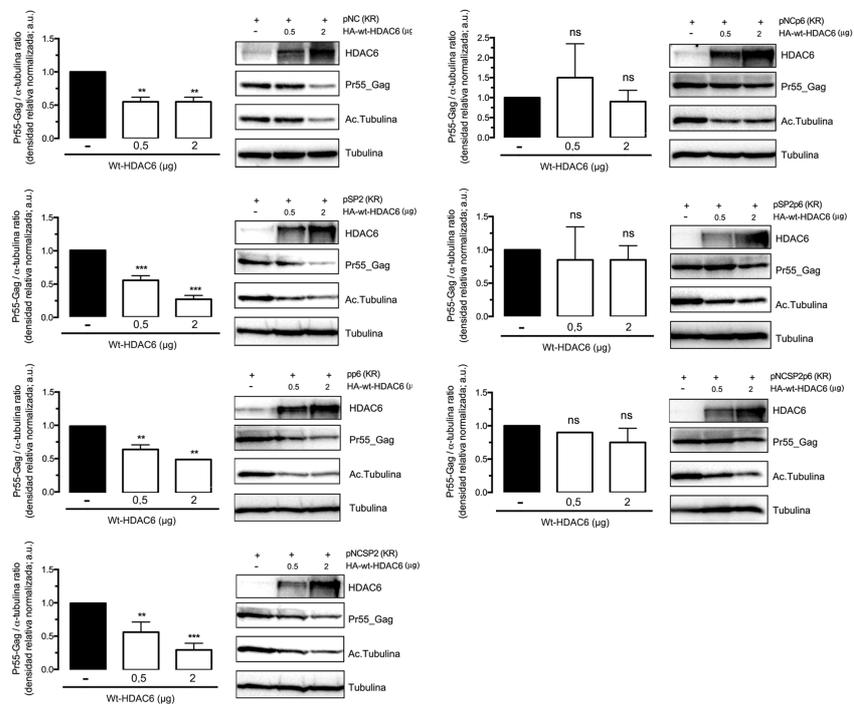


Figura 4.29: Estudio de las regiones de Gag ubiquitinables que le otorgan sensibilidad al efecto pro-degradativo de HDAC6.

Imágenes representativas de los ensayos bioquímicos acompañadas de las gráficas de cuantificación de todos los experimentos de los mutantes de Gag testados. En orden descendente y de izquierda a derecha se representan los resultados de los mutantes pNC(KR), pSP2(KR), pp6(KR), pNCSP2(KR), pNCp6(KR), pSP2p6(KR) y pNCSP2p6(KR). En todos los casos se tomó como referencia el valor de la señal de la proteína Gag en ausencia de HDAC6.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

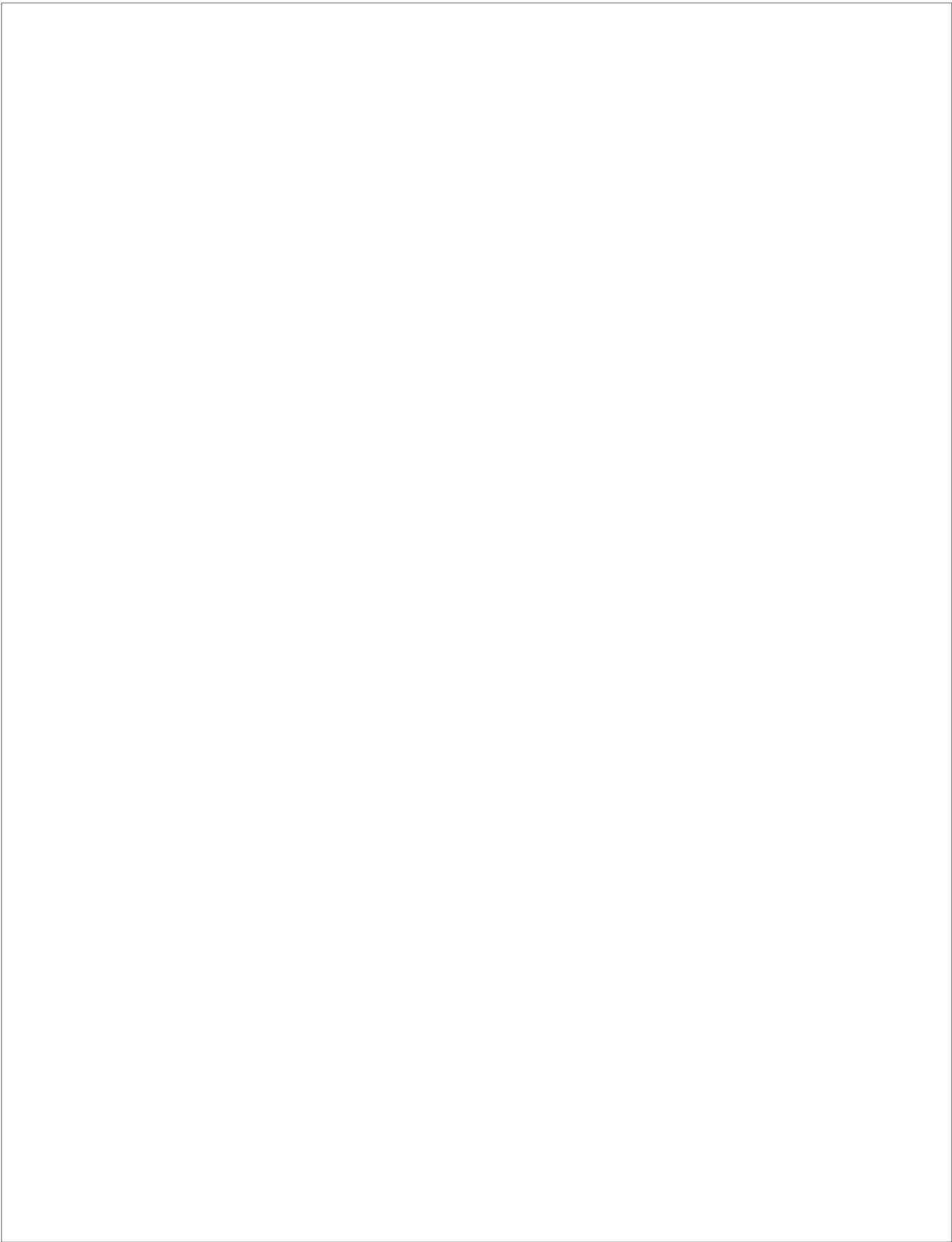
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

# 5

## DISCUSIÓN

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

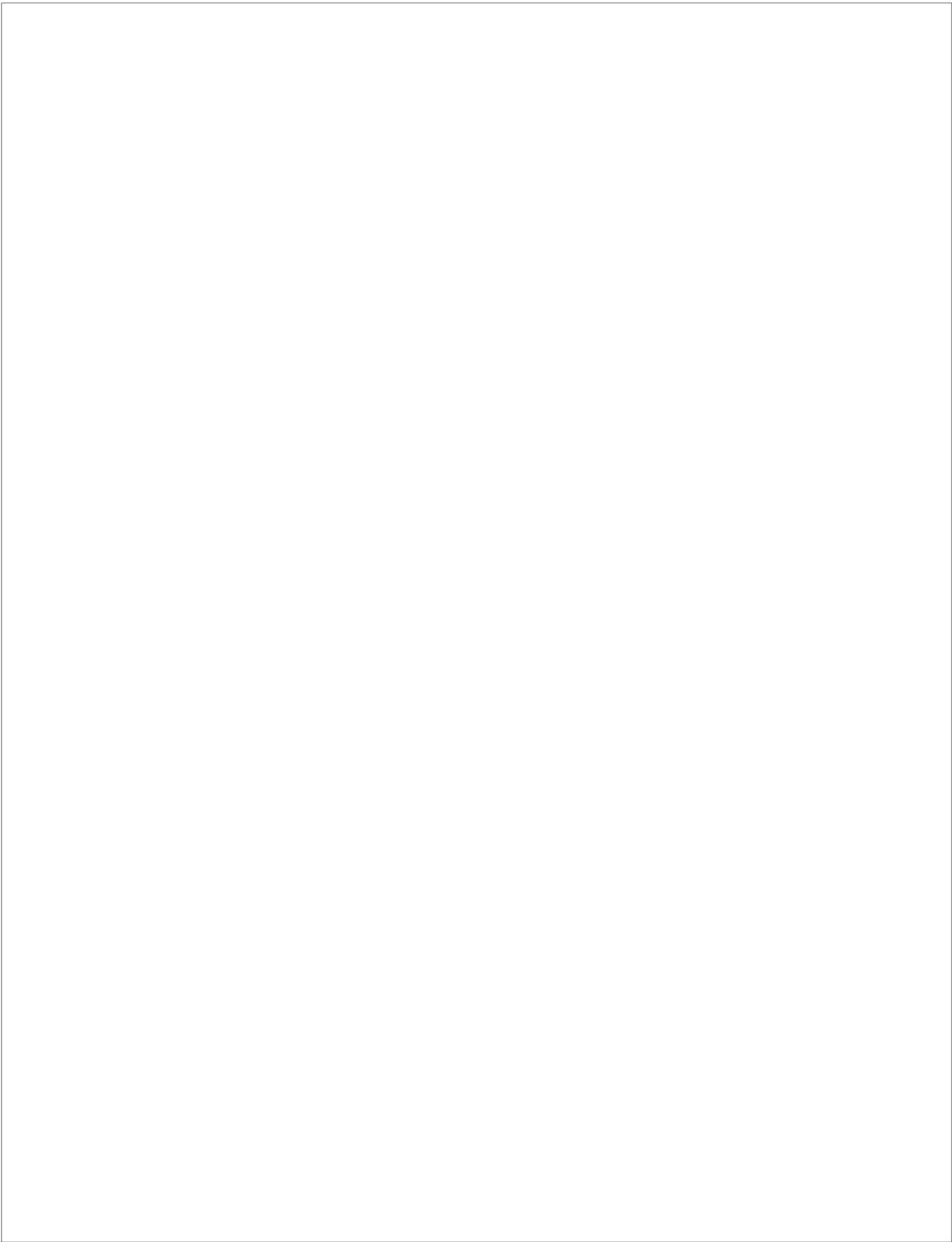
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

En este trabajo presentamos, por primera vez, el papel de protección de HDAC6 frente a una infección por VIH como un posible factor de restricción. Describimos como su capacidad de unión a Ubiquitina, junto con su capacidad de llevar agregados proteicos a ser procesados por la ruta autofágica, conlleva a una pérdida de la capacidad infecciosa del VIH y una menor producción de nuevos virus. Por un lado, HDAC6 mediante una promoción selectiva de la degradación de la proteína viral Vif consigue la protección del factor de restricción APOBEC3G, permitiendo que sea encapsidado en las nuevas partículas virales. El resultado final de la presencia de APOBEC3G dentro del virus es una baja capacidad de infección del mismo en los siguientes ciclos infectivos. Por otro lado, HDAC6 también focaliza su acción sobre la proteína estructural del VIH, Pr55-Gag. Promoviendo la degradación de esta proteína, que da lugar a la mayor parte de la estructura vírica, la producción de partículas virales se ve marcadamente afectada. De esta manera, HDAC6 dificulta la infección del VIH afectando tanto a la producción cualitativa como cuantitativa de los virus nacientes a partir de una célula ya infectada.

### 5.1 Después de 30 años, ¿sigue habiendo algo que descubrir sobre el VIH?

Desde la descripción por primera vez del SIDA y el descubrimiento del VIH, este retrovirus ha sido el causante de más de 40 millones de muertes en el mundo (16), lastrando la calidad de vida de los individuos infectados tanto a nivel de salud como el estigma social que supone ser portador de este virus. A pesar de la gran cantidad de estudios que han versado sobre este virus y su patogenicidad, aún quedan muchas incógnitas por resolver en torno a su ciclo de infección, las funciones que llevan a cabo todas sus proteínas y su capacidad para escapar de los mecanismos de defensa del individuo. Continuar con los estudios que nos arrojen luz sobre cómo el VIH interactúa con nuestro sistema de defensa, es esencial para aumentar las probabilidades de victoria en la batalla contra este virus. De las 6

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

proteínas accesorias propias del VIH no existe un relato cerrado sobre todos los roles que llevan a cabo como actores en la infección por el virus, incluso de la proteína accesoria más estudiada, Vif, siguen habiendo cuestiones sin resolver y propuestas de actividades alternativas a las firmemente reconocidas (258). Además de la publicación de nuevo trabajos que hablan de proteínas diferentes productos de *splicing* alternativos del genoma del VIH (259). Teniendo en cuenta la especificidad de estas proteínas, algunas como el Vpr exclusivas para el VIH-1, suponen un buen objetivo contra el que dirigirse en la búsqueda de nuevas dianas que debiliten o dificulten la dispersión del virus en el organismo.

Otro punto esencial en la lucha contra el SIDA es la información que nos aporta los mecanismos que tiene nuestro sistema inmune para intentar frenar la infección de este virus. El conocimiento de estos mecanismos nos permite conocer tanto los puntos débiles del virus que nuestro sistema intenta atacar, como las barreras que no resultan suficiente para frenar la infección y por tanto de manera exógena podrían reforzarse con tratamiento. Un ejemplo de ello son los factores de restricción, proteínas expresadas de manera constitutiva en la célula con actividad anti-VIH. Estas proteínas componen una barrera primaria a nivel celular contra la infección por un virus, aunque en el caso de la infección por VIH en humanos esta barrera no es lo suficientemente potente como para frenar la infección. En cambio, hay muchos ejemplos en simios, donde el virus predecesor al VIH, el SIV sí es controlado por el sistema inmune del animal, estableciéndose una infección crónica, una convivencia más o menos inocua para el individuo infectado que raramente desarrolla un estado de inmunodeficiencia (14,15,47). Muchos investigadores establecen que estas diferencias son debidas a que el VIH en su salto a los humanos aún no se ha adaptado evolutivamente al nuevo huésped y aún no existe un equilibrio entre el virus y nuestro sistema inmune que permita que el virus no acabe matando finalmente a su hospedador, evento que tampoco

resulta de interés para el virus (260). Con el descubrimiento de A3G como factor de restricción se abrió un foco de esperanza en la lucha contra este virus, planteando la idea de que un aumento en la expresión de A3G en el organismo y por tanto dentro de la célula, se lograría compensar la pérdida que supone la acción de Vif. El problema surge que, al ser A3G y la familia a la que pertenece una proteína que edita tanto ADN como ARN, un aumento desproporcionado de la actividad puede llevar una acción indiscriminada de la misma aumentando la probabilidad de desarrollo de tumores y cáncer (261,262). Por ello, aunque el apoyo o fomento de la presencia y acción de los factores de restricción podría suponer un buen objetivo, urge la necesidad de encontrar nuevos factores existentes cuyo fomento de la expresión no presente las consecuencias negativas de los ya estudiados. O adicionalmente, proteínas que, aunque no puedan considerarse factores de restricción, con su acción puedan proteger o fomentar la acción de dichos factores. Por ejemplo, como hemos explicado un aumento de la expresión de A3G más allá de los valores fisiológicos lleva al desarrollo de otras patologías no deseadas, en cambio en nuestra propuesta no provocamos un aumento de la presencia de esta proteína sino que mediante degradación específica de su factor negativo, Vif, evitamos que sea degradada pero sin aumentar sus niveles normales. Es decir, se mantiene a niveles fisiológicos no pro-patológicos, este podría ser un mecanismo óptimo de actuación. Por ello, nosotros nos centramos en el estudio de HDAC6, ampliando la descripción de sus funciones y abriendo la puerta a nuevas investigaciones que establezcan su posible rol como factor de restricción o al menos como colaborador relevante en la lucha contra el VIH.

## 5.2 Ayudando a la caracterización de HDAC6

HDAC6 es una proteína compuesta por 3215 aminoácidos y de unos 135 KDa, que pertenece a la gran familia de las histona desacetilasa (190,193). Su

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

descubrimiento fue seguido de multitud de estudios enfocados a averiguar la función que cumple en la célula ya que sus especiales características con respecto al resto de miembros de su familia ha intrigado a muchos investigadores. Es indudable su pertenencia a la familia de histonas desacetilasa tanto por su homología en su secuencia y como su característica actividad enzimática con función desacetilasa, pero el hecho de que sea el citoplasma su compartimento celular de localización y no el núcleo ha llevado a muchas cuestiones con respecto a la función que cumple en la célula (195,198). Además, el descubrimiento de su región conocida como BUZ, en su extremo C terminal, que presenta una de las más altas afinidades por la Ubiquitina descrita hasta la fecha (199,201), llevó a la búsqueda de una función específica que requiriese tanto una actividad desacetilasa, de sustratos diferentes a las Histonas y que fuesen citoplasmáticos, como el reconocimiento y unión a Ubiquitina.

Aunque aún queda mucho campo por explorar con respecto a todos los procesos donde HDAC6 parece cumplir alguna función o parece estar implicado, existe un consenso en la comunidad científica sobre el papel que cumple HDAC6 en el reconocimiento de agregados de proteínas ubiquitinadas y su procesamiento vía autofagia (245,263). HDAC6, gracias a su región BUZ reconoce y une las Ubiquitinas de estos agregados y actúa como nexo de unión entre ellos y la maquinaria de transporte que los agrupa formando agregomas. Estos, tras la formación de vesículas autofágicas que se fusionan con lisosomas, serán procesados por las enzimas y proteasas lisosomales (205,246). Además, HDAC6 también participa en este proceso modulando la dinámica de la red de microtúbulos, gracias a su actividad desacetilasa, facilitando el transporte retrógrado de estos agregados, también promueve la estabilización de la F-actina necesaria para los eventos de transporte y fusión de vesículas (218). De esta manera HDAC6 resulta clave para evitar la toxicidad que estos agregados proteicos suponen a la célula, que en

algunos casos pueden provocar pérdida de función o incluso muerte celular (205,245). Pero, algunos trabajos también le han otorgado cierto papel regulador del proceso de la autofagia, modulando por ejemplo la autofagia mediada por chaperonas a través de su sustrato HSP90, o regulando la mitofagia junto a p62 (202,203,217,246,247,263-266). Además, por su capacidad para modificar la dinámica del citoesqueleto celular puede participar o modular otros procesos celulares donde este fenómeno resulta esencial, como pueden ser los eventos de movilidad celular por quimiotaxis o el desarrollo y longitud de cilios (248,267,268)(269). También puede participar en eventos de la respuesta inmune (267,268).

Debido a todas estas características, muchos trabajos se han centrado en estudiar el rol de HDAC6 enfermedades neurodegenerativas que cursan muerte neuronal debido al depósitos tóxicos de agregados proteicos, como son el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o diferentes tipos de demencia senil (272-275). También se ha estudiado su posible rol en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer y su implicación en la formación de gránulos de estrés y la consecuente regulación en la transcripción de proteínas (215,276-279). Finalmente, algunos trabajos han indagado sobre cómo HDAC6 podría afectar al curso de una infección viral (183,253,280). En concreto, con respecto a una infección por VIH, se ha visto que su rol de modulador de la dinámica del citoesqueleto celular afecta a la formación del poro de fusión en el evento de entrada viral en la célula. Mediante la desacetilación de la subunidad  $\alpha$  de la Tubulina, contrarresta la acetilación de microtúbulos promovida por el virus y provoca una dinámica no deseada del citoesqueleto en ese punto de entrada dificultándose la formación del poro (183,281). También se ha visto que, la proteína reguladora de la expresión del genoma vírico, Tat, puede ser diana de HDAC6. Para la correcta función de

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

activación de la transcripción de los genes víricos por parte de Tat es esencial la acetilación de esta proteína en determinadas lisinas de la secuencia. Una de ellas es la lisina 48, HDAC6 en el citoplasma provoca la deacetilación específica de esta lisina afectando negativamente a la función de Tat (254).

En este trabajo de tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio de nuevas funciones de actividad de HDAC6 para hacer frente a una infección por VIH, siendo esenciales en estas funciones tanto su capacidad de unión a ubiquitina, su actividad desacetilasa y su papel en el proceso de autofagia.

### 5.3 HDAC6 afecta a la infectividad del VIH promoviendo la degradación de Vif y protegiendo así a A3G.

Aunque la célula diana del VIH son los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, nosotros decidimos basar la mayoría de nuestros ensayos en células 293T por la facilidad que presenta su manipulación en cultivo y que permite un amplio rango de técnicas de transfección (con nuestra línea celular linfoide CEM.NK<sup>R</sup>-CCR5 sólo es posible la técnica de nucleofección) para la expresión de proteínas recombinantes. También, al ser una línea celular permisiva carece de expresión endógena de A3G lo que nos facilitaba el trabajo en condiciones libres de este factor de restricción cuando fue necesario. Además, un problema a solventar fue el marcaje de esta proteína ya que en pocas ocasiones dispusimos de un anticuerpo efectivo que la reconociese de manera directa. Por lo que en la mayoría de los experimentos tuvimos que usar una proteína recombinante con una etiqueta que sí era fácilmente detectable (el A3G recombinante principalmente usado presentaba 3 epítomos en tándem de HA, aunque también usamos otras etiquetas como controles en algunos experimentos para comprobar que el tag no era un factor condicionante de los resultados).

Muchos de los trabajos que han versado sobre las acciones de Vif sobre A3G se han basado en estudios de bioquímica mediante *Western Blot*, donde se ha visto

que la presencia de Vif (ya sea por expresión de una proteína recombinante o Vif de origen proviral) provoca una disminución de la señal correspondiente a A3G. Por ello, en el desarrollo de nuestro trabajo para describir el efecto de HDAC6 sobre el tándem A3G/Vif, decidimos comenzar estudiando como HDAC6 podía afectar al *pool* de ambas proteínas mediante co-transfección de plásmidos y posterior análisis del estado de las proteínas por *Western Blot* y basamos la mayoría de nuestros experimentos en esta técnica bioquímica. Describimos como la presencia aumentada de HDAC6, lleva una disminución de la cantidad de Vif acompañada de una recuperación de los niveles de señal de la proteína A3G (**Fig. 4.4**).

Con estos resultados nos inclinamos a pensar que la presencia de HDAC6 promovía la degradación de Vif, quedando A3G libre de la acción pro-degradativa de Vif. Una de nuestras premisas para la formulación de nuestras hipótesis era que HDAC6 reconocía a estos sustratos gracias a su región BUZ de unión a Ubiquitina. Por ello, decidimos testar la respuesta de estas dos proteínas a la presencia de un mutante de HDAC6 carente de su dominio BUZ (HDAC6\_ΔBUZ). Parece ser que este dominio sí resulta esencial para provocar la degradación de Vif pero, sorprendentemente, a pesar de que los niveles de Vif no se veían disminuidos, la señal de la proteína A3G tampoco disminuía (**Fig. 4.4**). Estos resultados nos indujeron a pensar que este mutante de HDAC6, incapaz de promover la degradación de Vif, lograba proteger a A3G por una interacción competitiva a (215,282) través de regiones diferentes a la región BUZ.

Está ampliamente descrito en la bibliografía que A3G se encuentra de manera constitutiva formando parte de HMM y de LMM en el citoplasma celular, y que colocalizan junto con *P-bodies* y gránulos de estrés, siendo un componente de estas estructuras (129,283–285). HDAC6 está firmemente implicado en la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

formación de los gránulos de estrés y en su transporte (215,282). Por lo tanto, era posible, que de manera constitutiva ambas proteínas interaccionasen o co-localizasen sin necesidad de un estímulo como puede ser una infección vírica. Además, esta interacción constitutiva podría explicar la protección de A3G llevada a cabo por HDAC6\_ΔBUZ aún habiendo altas cantidades de Vif en la célula. Vimos mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y de microscopía confocal que ambas proteínas parecen interaccionar (**Fig. 4.6, Fig. 4.8 y Fig. 4.9**). Además, cuando testamos tres constructos de HDAC6 en los ensayos de co-inmunoprecipitación, HDAC6wt, HDAC6\_ΔBUZ y sólo la región BUZ, la co-inmunoprecipitación fue positiva para A3G en cualquiera de las 3 condiciones (**Fig. 4.7**). Demostrando así, que la interacción entre HDAC6 y A3G no se produce por una región única de HDAC6, sino que son varias regiones de HDAC6 que parecen participar en su unión con A3G, o una región tan extensa que abarca varios dominios de la proteína.

Los experimentos realizados por el equipo del Dr. Ricardo Madrid nos confirmaron las interacciones directas entre estas proteínas. En un entorno procariota, en ausencia del resto de componentes celulares se obtuvieron co-inmunoprecipitaciones positivas entre HDAC6 y los diferentes mutantes, A3G y Vif. Aunque estos resultados no se muestran en el apartado Resultados de este trabajo de tesis doctoral se muestran en el artículo científico recogido en el Anexo I.

### **5.3.1 HDAC6 y Vif interaccionan independientemente de la interacción con A3G.**

La presencia aumentada de HDAC6 en la célula lleva a un descenso en la señal de la proteína Vif. Aunque nos planteamos que ese fenómeno sería el resultado de una interacción o reconocimiento de Vif por parte de HDAC6 en el cual A3G actuaría como el nexo de unión o aproximación, los ensayos de co-

inmunoprecipitación realizados nos indicaron que la presencia de A3G no era indispensable para la interacción entre HDAC6 y Vif (**Fig. 4.10**). En este caso, debido a que la región BUZ sí resulta indispensable para promover la degradación de Vif, podía ser que fuese esa la región de interacción con esta proteína viral. En cambio, nuevos ensayos de co-inmunoprecipitación nos hicieron desechar esa idea al existir co-inmunoprecipitación positiva entre Vif y HDAC6\_ΔBUZ (**Fig. 4.10**). Nos encontramos frente a un escenario similar al visto para A3G, en el cual parece ser que la región BUZ resulta indispensable para la función de HDAC6, pero no para la interacción con las proteínas.

Con estos resultados nos planteamos que aunque A3G no es necesario para la interacción entre HDAC6 y Vif, sí podía resultar indispensable para provocar el efecto de degradación. Por ello, usamos dos mutantes de A3G que resultan insensibles a la degradación por Vif, pero que presentan diferente capacidad de interacción (255,257,286–288). Independientemente de esta sensibilidad a ser degradado por Vif o su capacidad de interacción entre A3G y la proteína viral, HDAC6 promueve la degradación de Vif (**Fig. 4.12**).

El mecanismo de acción de Vif pasa por una nucleación de diferentes componentes celulares hasta formar un complejo ubiquitina ligasa de tipo E3, en el cual Vif actúa como la subunidad de reconocimiento de sustrato, uniéndose a A3G y provocando que sea poli-ubiquitinado. Esta unión covalente de cadenas de Ubiquitinas a A3G de tamaño variable, puede ser visible mediante *Western Blot* por la aparición de un multibandeado cuando marcamos la proteína A3G. El número, altura e intensidad de estas bandas nos indican el grado de poli-ubiquitinación en el que se encuentra la proteína. Obviamente, la presencia de Vif nos muestra un aumento de este estado de ubiquitinación con respecto a una condición normal, observando mayor número de bandas (**Fig. 4.11**). La presencia

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

aumentada de HDAC6, provoca una disminución notable de la poli-ubiquitinación de A3G (**Fig. 4.11**), lo que explicaría la menor degradación de esta proteína en presencia de HDAC6. Un resultado sorprendente a este respecto fue ver el aumento en la poli-ubiquitinación de A3G en presencia de Vif y de HDAC6\_ΔBUZ. A pesar de que no hay degradación de Vif en presencia de este mutante, A3G tampoco es susceptible a la degradación promovida por Vif pero queda igualmente marcado por cadenas de Ubiquitinas que son señal para su degradación. Este punto nos hizo inclinarnos más firmemente por una protección competitiva por parte de HDAC6, ya que a pesar de que Vif logra reconocer y marcar a A3G para su degradación, esto finalmente no sucede, produciéndose una acumulación de formas de A3G poli-ubiquitinadas en presencia de HDAC6\_ΔBUZ. HDAC6\_ΔBUZ se mantendría acoplado a A3G impidiendo su entrada en el proteasoma, aunque en este punto desconocemos si este A3G continúa siendo efectivo en su función. Punto que abordamos más adelante en el trabajo.

Diversos trabajos indican la importancia de la nucleación del complejo de tipo E3 ubiquitina ligasa en la estabilidad de la proteína Vif. Se ha visto que principalmente la unión al factor CBF-β resulta clave en este proceso. La pérdida de CBF-β lleva a un descenso de los niveles de Vif dentro de la célula, algunos trabajos determinan que la unión con CBF-β protege a Vif de la degradación mediada por un complejo E3 ligasa (289–291). ¿Es posible que HDAC6 afectase a la nucleación del complejo afectando a un componente esencial como es CBF-β y que por ello Vif presente mayor inestabilidad? Para contestar a esta pregunta, marcamos la proteína CBF-β en ensayos de *Western Blot*, en condiciones de expresión de Vif y HDAC6 y sin encontrarse A3G presente. Nuestros resultados nos indicaban que una presencia aumentada de HDAC6 no afecta a los niveles de proteína de CBF-β, manteniéndose invariable. En cambio, Vif, nuevamente sufría una disminución de su señal, pensamos entonces que HDAC6 de manera directa promueve que Vif sea

degradado de manera específica, sin afectar a otros componentes del complejo (Fig. 4.13). Con respecto al reconocimiento y promoción de la degradación de Vif por parte de HDAC6 nos apoyamos en los diferentes estudios que muestran que Vif sufre modificaciones post-traduccionales de unión a ubiquitina en la célula. Vif sufre ubiquitinaciones en su secuencia que no suponen una señal pro-degradativa (292,293). Se piensa que, similar a lo que ocurre con Gag, estas modificaciones sirvan como señal para su transporte a la membrana y pueda encapsidarse dentro del virión. Además, al formar el complejo de ubiquitina ligase de tipo E3 para promover la poliubiquitinación de A3G, Vif también sufre esta modificación de manera aumentada (294). Por ello, nosotros proponemos que aunque no resulta necesaria esta modificación para el reconocimiento de Vif por parte de HDAC6, ya que las co-inmunoprecipitaciones con el mutante HDAC6\_ΔBUZ dieron positivas, esta modificación sí resulta esencial para el reconocimiento de Vif por parte de HDAC6 a través de su dominio BUZ y promover su degradación.

Aunque no existen muchos estudios sobre la expresión en el organismo de HDAC6, las primeras evidencias muestran que, aunque su presencia es generalizada, existe una mayor presencia de esta proteína en tejido neuronal, tejido mieloide y tejido germinal y dermis (295). De manera fisiológica esta proteína se encuentra presente en regiones dianas de infección del VIH pero, aún así, la infección casi en todos los casos resulta exitosa para el virus. ¿Podría ser posible que los efectos que veíamos en condiciones de sobre-expresión de HDAC6 eran el resultado de la expresión de esta proteína recombinante pero que la proteína endógena no presentase estas funciones? Para resolver esta cuestión, decidimos silenciar la proteína HDAC6 endógena que producen las células en condiciones basales y enfrentar a la célula a una expresión de la proteína Vif. Vimos que en las células donde HDAC6 fue silenciada, disminuyendo su presencia en más

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

de un 50 % en todos los experimentos, la señal de Vif estaba claramente aumentada con respecto a una condición control de no silenciamiento (**Fig. 4.14**). Efecto similar que también observamos en los niveles de poli-ubiquitinación de A3G, donde el silenciamiento de HDAC6 endógeno llevaba a un aumento de su señal pro-degradativa y de su degradación (**Fig. 4.11**). Gracias a estos resultados, concluimos que el HDAC6 expresado por la célula presenta una acción anti-viral igual que el HDAC6 recombinante. A pesar de estos resultados, es evidente que la cantidad fisiológica de HDAC6 no es suficiente para proteger a A3G e impedir la aparición de la fase SIDA, o es posible que exista algún componente viral cuya acción contrarreste el rol de HDAC6.

### 5.3.2 HDAC6 promueve la inestabilidad de Vif haciendo uso de la ruta autofágica de degradación

El proteasoma es el complejo por excelencia de procesamiento y degradación de proteínas en la célula, y Vif hace uso de él para que A3G sea degradado (296,297). Por ello, aunque fue nuestra primera apuesta sobre la vía a través de la cual Vif se degradaba no podíamos olvidar la estrecha relación que HDAC6 tiene con la vía degradativa de la autofagia. La autofagia es un proceso cuya finalidad, se pensaba en un principio, era la del reciclado de componentes celulares en condiciones extremas o de estrés para la supervivencia celular, incluso se consideraba un evento en perjuicio de la célula ya se veía que era una fase previa a la apoptosis (222,298,299). Diversos estudios han demostrado que este proceso no sólo está relacionado con condiciones de estrés o de apoptosis, si no que cumple múltiples funciones de transporte, reciclado, eliminación de residuos, eliminación de patógenos, etc. en la célula y que incluso de manera basal se encuentra activo (229,300-302). Es evidente la alta complejidad de este proceso con multitud de rutas, actores y reguladores. Como hemos dicho, la implicación de

HDAC6 en este proceso fue detalle suficiente para plantearnos comprobar si Vif era degradado a través de la ruta autofágica.

Nuestro abordaje se basó en bloquear ambas rutas añadiendo inhibidores específicos ampliamente usados y siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Cuando bloqueamos el proteasoma no conseguimos frenar la degradación de Vif, es más, observamos un aparente aumento en la degradación. Parecía que el bloqueo del proteasoma fomentaba la degradación de la proteína. En cambio, al inducir un bloqueo del proceso de la autofagia, en eventos muy tempranos de la ruta, observamos una estabilización de Vif. (**Fig. 4.16**). Ambos resultados nos conducían a la conclusión de que era la autofagia la ruta utilizada para el procesamiento de Vif, ya que uno de los eventos que puede activar la autofagia basal es el estrés que conlleva el bloqueo del proteasoma, al encontrarse en estas condiciones la autofagia aumentada, el procesamiento de Vif resulta más efectivo y drástico.

Además, esta idea se reafirma al someter a Vif a la presencia de un mutante de HDAC6 que carece de actividad desacetilasa. Este mutante, HDAC6<sup>dm</sup>, provoca en la célula un defecto en la autofagia, ya que, aunque presenta intacto su dominio de reconocimiento de Ubiquitina, carece de su actividad desacetilasa afectando gravemente a su actividad sobre la Cortactina, afectando a la red de Actina y por tanto a la fusión de vesículas autofágicas y lisosomas y también a la función de transporte de cargos ubiquitinados y en todas aquellas funciones donde esta actividad es necesaria (245,276,303). La presencia de este mutante, que al ser expresado en cantidades muy superiores a la proteína funcional endógena, compete con ella en sus dianas (de ahí que observemos, por ejemplo, un aumento de la  $\alpha$ -Tubulina acetilada por su presencia) lleva a una no degradación de Vif (**Fig. 4.15**). Lo mismo ocurre en el caso del mutante HDAC6\_ $\Delta$ BUZ, que aunque presenta

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

la capacidad desacetilasa, no es capaz de unir a proteínas ubiquitinadas y trasladarlas a las vesículas autofágicas por lo que no logra unirse a Vif y llevarlo a degradar. Aunque vimos que sí podía interactuar con él en los ensayos de co-inmunoprecipitación.

### 5.3.3 HDAC6 afecta a la infectividad de las nuevas partículas virales, como consecuencia por la degradación de Vif,

Un aspecto que dejamos pendiente fue la funcionalidad de A3G, que gracias a la presencia tanto de HDAC6 como de HDAC6\_ΔBUZ no es degradado por Vif. Es decir, ¿este A3G podría encapsidarse y realizar su función en el siguiente ciclo viral tal y como ocurre en infecciones con virus que son VIH-Δvif?, es decir, ¿afecta HDAC6 a la infectividad viral de las partículas nacientes?

Para contestar a estas cuestiones realizamos ensayos de infección con stocks virales producidos en presencia de HDAC6 y de HDAC6\_ΔBUZ, además de intentar detectar en los virus la presencia de A3G. Antes de realizar los ensayos de infección cuantificamos mediante ELISA la p24 en los sobrenadantes, de tal manera que usamos diferentes volúmenes de sobrenadante para los ensayos, pero misma carga viral. Así, eliminamos la variable de diferencias en el número de virus presentes en los sobrenadantes que nos pueden falsear resultados. Los virus producidos en condiciones de presencia aumentada de HDAC6 muestran una capacidad disminuida de infección en comparación con los virus controles, además de detectar en su interior A3G. La acción de HDAC6 contra la proteína vírica Vif, lleva a la protección de A3G permitiendo que esta proteína cumpla su función de factor de restricción anti-VIH provocando la disminución en la capacidad infecciosa característica de los virus VIH-ΔVif (**Fig. 4.17** y **Fig. 4.18**). En los ensayos realizados con HDAC6\_ΔBUZ, detectamos también presencia de A3G en las partículas víricas, pero en este caso no había un aumento de la infectividad de estos virus. Es posible

que, aunque HDAC6\_ΔBUZ evita que A3G se degrade, al no evitar su marcaje con Ubiquitinas esta proteína no resulta funcional. Es posible que, al entrar transportada por el virus en la nueva célula la maquinaria de la misma la detecte como sustrato a ser degradado por el proteasoma, o que estas modificaciones afecten estructuralmente a la proteína de tal manera que no pueda interactuar con el ADN o provocar desaminaciones (Fig. 4.18).

#### 5.4 HDAC6 modula negativamente la estabilidad de la proteína estructural Pr55-Gag.

Uno de los eventos más estudiados y sobre el cual aún existe cierta controversia del ciclo del VIH, es el proceso de salida y maduración viral. Se sabe que la proteína Pr55-Gag (Gag) es el principal actor en este proceso, ya que su sola expresión en la célula lleva a la formación de partículas virales similares a virus (VLPs) (304,305) y la maduración de la partícula es el resultado del procesamiento de esta poliproteína por la Proteasa viral que acaba formando la estructura proteica del cuerpo viral (159,306). Aunque algunos trabajos hablan de que la salida del virus se produce una vez finalizada la maduración de la partícula viral, la idea más aceptada es que cuando un virus es liberado, éste se encuentra en un estado inmaduro y no infectivo. Finalmente con la actuación de la Proteasa viral y la disposición adecuada de los componentes virales, se alcanza la madurez del virus y se puede observar la morfología típica del core (24,159,307-310). Gag una vez es expresada ha de viajar por la célula y acoplarse en zonas concretas de la membrana plasmática ricas en colesterol y con una composición lipídica determinada, a partir de las cuales se originará el punto de salida viral. Aunque quedan muchos aspectos por descubrir sobre cómo sucede este proceso, se conoce la importancia que tiene la ubiquitinación de Gag para su transporte hacia

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

la membrana de la célula. Además, esta proteína tiende a formar agregados tanto cuando se ancla a la membrana como en eventos anteriores (311–314).

Por ello, nos planteamos estudiar si tal vez, HDAC6 podía ejercer algún tipo de efecto negativo sobre esta proteína estructural basándonos tanto en la necesidad de Gag de ser ubiquitinada, en la tendencia a formar agregados como en el uso que hace de las vías de transporte de vesículas de la célula para su viaje hacia la membrana, todos estos eventos fácilmente interconectados con la actividad de HDAC6. Iniciamos nuestros estudios observando la estabilidad de Gag en presencia de cantidades aumentadas de HDAC6 en ensayos de bioquímica mediante *Western Blot*. Fue sorprendente la respuesta de esta proteína, la señal de Gag se veía claramente disminuida en presencia de HDAC6, siguiendo una respuesta dependiente a la cantidad de HDAC6 sobre-expresada (**Fig. 4.19**).

Mediante ensayos con microscopía confocal y con una proteína Gag recombinante que tenía tras su región C terminal y en fase con su marco de lectura acoplada la GFP (*Green fluorescent protein*, proteína verde fluorescente) observamos los característicos acúmulos de proteína que se producen cuando es expresada (**Fig. 4.22**). Al expresar, además HDAC6, el porcentaje de células que presentaban este patrón característico de punteados verdes disminuía significativamente (de un 80 % de células con patrón punteado a un 50 % de células en la condición con HDAC6) (**Fig. 4.22**). Teniendo en cuenta la importancia que tiene este comportamiento de acumulación de proteína en el proceso de salida y maduración viral, podemos suponer que HDAC6 estaría afectando gravemente a la producción de virus.

No sólo la modificación con Ubiquitina de Gag (173,181) puede hacerla susceptible a ser reconocida por HDAC6, sino que además esta tendencia a agruparse que vimos en nuestras imágenes de microscopía puede servir como un

reclamo adicional para la actuación de HDAC6. Estos efectos que veíamos podían fácilmente llevar a una menor producción de partículas víricas, pero no sabíamos si además podría estarse afectando a la capacidad infectiva del virus. Por ello realizamos, como en el el caso anterior del estudio de A3G/Vif, ensayos de infección con stock virales producidos en presencia de cantidades crecientes de HDAC6. Por motivos técnicos en estos casos no fue posible realizar una cuantificación previa de la p24 por lo que decidimos utilizar volúmenes iguales de sobrenadante y corregir más adelante nuestros resultados. Inicialmente parecía que HDAC6 afectaba a la infectividad de los virus ya que detectamos un descenso de la capacidad infectiva proporcional a la cantidad de HDAC6 expresada (**Fig. 4.20**). Recordemos que la producción de los stocks virales se realiza en células 293T que al ser permisivas no expresan de manera endógena el factor de restricción A3G, por lo que este efecto en la infectividad viral no podría explicarse, como en los experimentos anteriores, por la acción de este factor. Tras la realización de los ELISA de p24 en los sobrenadantes vimos que existía una disminución con la misma tendencia que la observada en los ensayos de infección. Concluimos, por tanto, que HDAC6 actúa sobre Gag promoviendo su degradación y la pérdida de agregados, y que esto resulta en una menor liberación de partículas virales. Es decir, que los resultados obtenidos en los ensayos de infección eran el resultado de una menor cantidad de virus por  $\mu\text{L}$  usado y no que estos virus fuesen menos infecciosos.

#### **5.4.1 El dominio de unión a Ubiquitina, BUZ y la actividad desacetilasa de HDAC6 resultan indispensables para la acción pro-degradativa contra Pr55-Gag.**

En el estudio del rol sobre la estabilidad de Gag de los diferentes constructos de HDAC6, repetimos los experimentos de transfección y posterior análisis por

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

*Western Blot*. Al igual que lo visto en el apartado sobre A3G/Vif, fue evidente la incapacidad del mutante HDAC6<sup>dm</sup> de promover la degradación de Gag, lo que nuevamente nos reafirma la importancia de la ruta autofágica para esta acción anti-viral de HDAC6, punto que abordaremos más adelante (**Fig. 4.23**). En relación a los resultados obtenidos con la fracción BUZ de HDAC6, que a pesar de no poseer actividad enzimática propia y corresponder tan solo a una fracción de 374 aminoácidos de la proteína total, observamos una disminución de la señal de Gag en presencia de este constructo (**Fig. 4.23**). Planteamos que esta fracción ejerce un efecto “llamada” sobre el HDAC6 endógeno. La afinidad que presenta esta región por la Ubiquitina resulta mucho mayor cuando es expresada en solitario que cuando forma parte de la proteína íntegra (201), por ello, planteamos que esta fracción con capacidad de reconocer a Gag ubiquitinado se uniría a él con alta especificidad, aumentan así el tamaño y presencia de los aglomerados de proteína. De esta manera, el HDAC6 endógeno reconoce estos acúmulos de manera más eficiente, promoviendo su procesamiento y degradación.

Por otro lado, el resultado más contradictorio es el obtenido en los ensayos con HDAC6\_ΔBUZ, ya que, aunque la variación a la baja de la señal de Gag en presencia de este mutante apenas es del 20 %, esta variación resulta significativa (**Fig. 4.23**). Mantenemos nuestra hipótesis inicial de la importancia tanto de la región BUZ de la proteína como de su actividad desacetilasa para su función anti-VIH y este resultado lo que nos avala es el rol del HDAC6 endógeno en el proceso: la sobre-expresión de HDAC6\_ΔBUZ, un mutante de HDAC6 que mantiene sus dominios enzimáticos activos, aunque no logre reconocer a los sustratos que ha de dirigir a las vesículas autofágicas, sí puede favorecer la dinámica del citoesqueleto de microtúbulos y Actina y por tanto facilitar la fusión de autofagosomas con los lisosomas, además de otras funciones donde la actividad desacetilasa es importante para el mecanismo autofágico. Es decir, proponemos que este

constructo estaría facilitando la función del HDAC6 endógeno, y por ese motivo vemos esta respuesta, leve, aunque significativa de degradación de Pr55-Gag en presencia de este mutante. En relación a por qué hemos observado este efecto de HDAC6\_ΔBUZ en estos ensayos y no durante el estudio de la acción negativa sobre Vif, basamos esta diferencia en que, de manera estandarizada, en nuestros ensayos de expresión de proteínas recombinantes y análisis bioquímico por *Western Blot*, realizamos entre tres y cinco réplicas del experimento (siempre número impar) para verificar los resultados obtenidos. Esta técnica, aunque sencilla, presenta multitud de factores que pueden afectar al resultado, eficiencia de transfección de los plásmidos, diferentes eficiencia de expresión de los mismos, cuantificación de proteína total y finalmente la técnica de *Western Blot*, que tiene varios pasos limitantes o que pueden inducir variación. En esta ocasión, llegamos a realizar entre trece-quince réplicas independientes de estos experimentos por problemas técnicos que sufrimos en el desarrollo del trabajo. Así, acumulamos esa cantidad de lisados celulares que finalmente sometimos a *Western Blot* y los tuvimos en cuenta para nuestros análisis. Por ello, en esta ocasión al aumentar nuestra n de manera tan considerable fuimos capaces de detectar este leve efecto a través de una técnica semicuantitativa y que difícilmente discrimina pequeñas diferencias en la cantidad de proteína entre diferentes lisados celulares.

#### 5.4.2 HDAC6 hace uso de la ruta autofágica para promover la degradación de Pr55-Gag.

En relación a qué posible vía podría estar dirigiendo HDAC6 a Gag para degradar, nos centramos en el estudio de la ruta autofágica como la opción más segura, aunque también decidimos comprobar la ruta proteasómica. Nuevamente, presentamos la vía autofágica como la vía de degradación usada por HDAC6 para promover la degradación de Pr55-Gag. En esta ocasión, tras un nuevo análisis de la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

bibliografía, decidimos bloquear la autofagia usando dos inhibidores diferentes que afectasen a puntos diferentes del proceso. Un inhibidor de los eventos primeros del proceso (3-MA, el mismo que fue usado en los experimentos anteriores) y otro inhibidor que bloquea el evento final de fusión de los lisosomas con las vesículas autofágicas. Decidimos abordar de esta manera este estudio debido a la alta complejidad del proceso.

El inhibidor usado con anterioridad, el 3-MA, es un inhibidor de la fosfatidilinositol 3-quinasa de tipo III (PI3K clase III) cuya actividad es la fuente principal de fosfatidilinositol 3 fosfato en este proceso, componente esencial para la formación del fagóforo (vesícula primera que engloba los componentes que serán degradados) y para el inicio y desarrollo de la autofagia. Pero existen otras vías de producción de esta molécula, además de rutas alternativas denominadas no canónicas que conducen también a la activación del proceso de la autofagia (315–317). Por ello, decidimos también usar la Bafilomicina A, un inhibidor de la bomba de protones, que bloquea la fusión de los lisosomas con los autofagosomas, provocando un bloqueo de la autofagia en fases tardía del proceso. De esta manera, consideramos que estábamos abordando un amplio rango del proceso y que un resultado positivo en el bloqueo de la degradación de Gag en ambas condiciones nos indicaría de manera casi inequívoca que HDAC6 promueve la degradación de esta proteína viral haciendo uso de esta ruta celular. Nuestros resultados, efectivamente, nos indicaron este hecho (**Fig. 4.25** y **Fig. 4.26**).

Desde hace años diversas investigaciones han revelado la importancia de la autofagia durante el proceso de infección vírica, tanto como un evento beneficiario para el virus por el uso que hace el patógeno de este sistema, como de mecanismo de lucha celular en contra del virus. Siendo tan complejo este sistema que

podemos encontrar escenarios donde el virus fomenta el proceso autofágico y eventos donde induce su inhibición (243,318,319). Varios trabajos describen como la infección por VIH fomenta el flujo autofágico potenciando el ensamblaje y producción y liberación de virus (320–322). También se ha observado como la autofagia afecta de manera negativa en nuestro sistema inmune participando en la depleción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, algunos estudios han revelado que la proteína de la envuelta viral, Env, de células infectadas está implicada en la muerte de linfocitos CD4<sup>+</sup>. Las células infectadas expresan en su superficie esta proteína viral que por contactos con las células circundantes activan la autofagia conduciendo finalmente a la apoptosis (323–325). También encontramos el ejemplo de una proteína viral no muy conocida, ASP (*Antisens Protein*, proteína antisentido), esta proteína es producida a partir de un transcripto que se origina en la región LTR 3' del genoma viral. Según diversos estudios, ASP co-localiza con LC3 y podría inducir la autofagia incrementando así la replicación viral (326,327). En muchos casos, la inducción de la autofagia por parte del virus está centrada a eventos o fases concretas, inhibiéndose, por ejemplo, las últimas fases como la fusión de autofagosomas con los lisosomas (322). También encontramos otro ejemplo de la bibliografía donde un actor importante del proceso autofágico como es LC3, contribuye a la acción de la proteína viral Vpu en contra de la restricción de Teterina, favoreciendo así la liberación de nuevos virus, a través de una vía no canónica de la autofagia (328). A pesar de estos ejemplos donde el virus parece fomentar el proceso autofágico para su beneficio, son muchos los casos donde se ha visto que este proceso, dirigido por la célula, resulta perjudicial para su ciclo y por lo tanto el virus intenta inhibirlo (329–331). Un ejemplo de ello, resulta la degradación de la proteína transactivadora Tat que tras ser reconocida por p62 es degradada vía autofagia (332). Además, este hecho resulta interesante ya que, Tat también es diana de HDAC6 que mediante su desacetilación lleva a un control negativo de su actividad. Es

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

posible que además de la desacetilación, HDAC6 también pueda afectar negativamente a su estabilidad participando en su degradación autofágica. Más en concordancia con nuestro trabajo, encontramos un estudio donde se describe que la ubiquitinación de Gag lleva a su degradación lisosomal. La proteína BCA2 es un Ubiquitina ligasa E3 que se había descrito como un co-factor de la actividad de restricción viral de la Teterina, pero que carecía de actividad anti-viral en ausencia de dicho factor de restricción. En este estudio se vio que la sobre-expresión de BCA2 provocaba la ubiquitinación de Gag y que ésta era finalmente degradada vía lisosomas, viendo incluso que la inhibición del proteasoma incrementaba la degradación de Gag y por tanto la liberación de nuevas partículas virales, tal y como observamos nosotros en nuestros ensayos (333). En base a estos datos y conjugándolos con nuestros resultados, podemos interpretar que resulta altamente factible que HDAC6 sea un colaborador esencial en el evento que este grupo de investigación describió, siendo el actor que reconociese a Gag y la llevase a degradar vía autofagia. Debido a estas posibles vías de actuación frente al virus que implican a este proceso degradativo encontramos una proteína viral accesoria a la cual se le ha descrito actividad inhibitoria del proceso de maduración pero no de la activación de la autofagia. Esta proteína es Nef, la cual se ha visto que interacciona con Beclina 1, proteína esencial en el desarrollo y maduración del autofagosoma impidiendo así, el desarrollo del proceso (322,330,334,335).

#### **5.4.3 La proteína Pr55-Gag de origen proviral resulta igualmente sensible a la inestabilidad promovida por HDAC6**

Finalmente, al término de este trabajo tuvimos la oportunidad, gracias a una estancia predoctoral, de trabajar en un laboratorio de bioseguridad de nivel 3, por lo que contamos con las condiciones de seguridad óptima para realizar algunos experimentos con virus completos e infecciosos. Aunque el número de experimentos realizados fue un factor limitante debido al escaso tiempo

disponible, los resultados obtenidos fueron muy alentadores. Repetimos los experimentos de sobre-expresión de HDAC6wt, HDAC6\_ΔBUZ y HDAC6dm con un provirus completo. En estos experimentos realizamos ensayos de bioquímica de las células productoras, ensayos de infección y cuantificación de p24 en los sobrenadantes. Observamos que la respuesta de Gag, en los ensayos de *Western Blot*, por la presencia aumentada de HDAC6wt, HDAC6\_ΔBUZ y HDAC6dm era la esperada (**Fig. 4.27**). Los ensayos de infección para valorar si los virus presentaban disminución de su capacidad infectiva se basaron en el cálculo de TCID50 por mL. Este parámetro, comúnmente usado para la caracterización de un stock o cepa viral, nos indica la dosis necesaria de dicho stock para provocar la infección del 50 % de nuestro cultivo celular. Aunque la lógica nos indicaría que a mayor TCID50/mL menor capacidad de infección ostenta dicho stock, este valor suele formularse como el denominador de la dilución, por lo que a mayor número mayor infectividad. Al igual que los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, aunque aparentemente vemos una disminución de la capacidad infecciosa de nuestros virus debido a la presencia de HDAC6, este efecto es corregido al cuantificar la p24 en el sobrenadante que se relaciona con cantidad de partícula viral ( $8 \cdot 10^{-5}$  pg de p24 equivalen a una partícula viral). Esta corrección tanto en el caso de HDAC6wt como de HDAC6\_ΔBUZ nos indica que HDAC6 no parece afectar a la funcionalidad de los virus, pero sí a la cantidad de virus liberados. En cambio, fue muy sorprendente la respuesta obtenida al sobre-expresar el mutante HDAC6dm, donde vimos una disminución de la TCID50/mL relacionada con la presencia aumentada de HDAC6dm. Aunque en un principio nos sorprendió este resultado, podemos razonar que este mutante compite con el HDAC6 endógeno en todas sus funciones, en concreto nosotros testamos el aumento de la acetilación de  $\alpha$ -Tubulina, pero asumimos que hay más eventos donde HDAC6 interviene y HDAC6dm está ocupando su lugar. La autofagia es un proceso que, en este caso, la

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

célula usa a su favor en la lucha contra el virus, pero éste es un proceso dinámico que como muchos estudios indican puede afectar negativa o positivamente al ciclo del virus dependiendo del momento del ciclo viral y tal y como hemos explicado anteriormente, algunos trabajos apuntan como el VIH y otros virus, bloquean o inhiben la autofagia y el transporte de vesículas según su conveniencia (242,244,319,322,328,336). Es posible que al ser este mutante defectivo para su acción desacetilasa, esté provocando un déficit en el transporte de componentes virales necesarios para la correcta función del virus. De tal manera que, aunque la producción de Gag y por lo tanto de partículas virales no se ve afectada en número, cualitativamente estos virus resultan menos infectivos que los virus controles (**Fig. 4.28**). Este resultado nos abre la puerta a seguir investigando todas las posibles funciones en las cuales HDAC6 interviene y parecen necesarias para una infección exitosa del virus, y por tanto que resulten dianas de ataque o bloqueo de dicha infección.

Para finalizar nuestra exploración de la relación entre HDAC6 y Gag, analizamos cuales de las regiones de Gag que son dianas de ubiquitinación resultan esenciales para el reconocimiento por parte de HDAC6. Los trabajos del Dr. HG. Kraüsslich, revelaron que aunque la región de Gag que requiere ser ubiquitinada para una correcta maduración viral y liberación del virus, es la región C terminal, no existe una zona o lisina indispensable y concreta para esta modificación post-transcripcional. La pérdida de ciertas lisinas, dianas de ubiquitinación, en la secuencia es compensada por la ubiquitinación de otras lisinas. En concreto, este equipo descubrió que era la combinación de la pérdida de lisinas de las regiones NC y p6, y la pérdida total de todas las lisinas de la región C terminal de la proteína la que afectaban más dramáticamente a la liberación del virus (181,182,337). Considerando la elevada tasa de mutaciones que presenta este virus, este hecho exhibe cierta lógica ya que en caso contrario arriesgaría a perder una región o

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

aminoácido esencial en cualquier evento infectivo. Usando los mismos mutantes de Gag que el equipo del Dr. HG. Kraüsslich, realizamos ensayos de bioquímica en presencia de HDAC6wt. Los primeros mutantes testados, que presentaban la pérdida de lisinas (sustituidas por argininas) sólo en las regiones de la nucleocápside (NC), del péptido espaciador 2 (SP2) o de la región p6, no presentaron cambios en su respuesta ante HDAC6. Produciéndose el mismo efecto de degradación que observamos con una proteína Gag *wild type* o salvaje. El mismo efecto observamos cuando las regiones NC y SP2, en conjunto, carecían de lisinas. En cambio, cuando la región p6 en combinación con alguna de las anteriores o las tres regiones carecían de lisinas disponibles a la ubiquitinación, la estabilidad de la proteínas Gag se mantuvo invariable a pesar de la presencia de HDAC6 (Fig. 4.29).

Aunque como hemos resaltado, no hay una lisina o región indispensable para la ubiquitinación de Gag, ciertas regiones en conjunto, sobre todo en regiones más C terminal, presentan un fenotipo más óptimo de salida y maduración viral. Por ello, ya sea de manera aleatoria o intencionada el virus preferentemente será ubiquitinado en esas regiones para optimizar la salida de viriones. Nos resulta entonces lógico encontrar que HDAC6 presente preferencia de reconocimiento por las regiones que con mayor probabilidad serán ubiquitinadas, regiones C terminal de la proteína. También barajamos la idea de que esta preferencia no este basada en eventos evolutivos, si no que por motivos conformacionales, aunque otras regiones de Gag se encuentren ubiquitinadas, HDAC6 no sea capaz de reconocer o unirse a esas Ubiquitinas y por lo tanto no podría arrastrar a Gag a la ruta de degradación.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

### 5.5 HDAC6 como un nuevo factor de restricción anti-VIH

Algunas investigaciones han relacionado funciones de HDAC6 con una actividad antiviral en contra del VIH, principalmente en eventos iniciales de la infección impidiendo la entrada viral y evitando que la célula sea infectada. Nuestro trabajo se centra en eventos posteriores del ciclo. Una vez el virus establece una infección productiva dentro de la célula la siguiente barrera sería evitar la producción de virus que infecten nuevas células y evitar así la propagación del patógeno por el organismo. Nosotros describimos como HDAC6 mediante el reconocimiento de la proteína accesoria Vif ubiquitinada, modificación habitual y también consecuencia de su actividad, promueve su degradación vía autofagia. Al hacer disminuir la proteína Vif en la célula, el factor de restricción A3G queda libre para ser encapsidado en las nuevas partículas virales realizando su función en el siguiente ciclo de infección. Además, también describimos que HDAC6 promueve la degradación de Pr55-Gag, reconociéndolo gracias a su tendencia a formar agregados y por la necesidad que presenta a ser ubiquitinado. La degradación de Pr55-Gag, también vía autofagia, impide la producción de nuevas partículas virales. Además, en este trabajo también aportamos nuevos aspectos sobre la importancia del proceso autofágico como participante fundamental en la defensa de la célula frente a una infección por este virus.

De esta manera, proponemos que una vez establecida una infección productiva dentro de una célula, HDAC6 ejercería una acción protectora del organismo en conjunto. Por un lado, la degradación de una proteína estructural del virus hace disminuir el *pool* de virus liberados por la célula y además, al provocar la degradación de la proteína accesoria Vif y permitir la encapsidación de A3G en el virión, los virus que si logran ser liberados presentarán una capacidad infectiva muy disminuida. Así, limitaría la infección sistémica y como consecuencia última, la

evolución final a SIDA. Por todos estos resultados, animamos a la comunidad científica a considerar esta proteína celular, HDAC6 como un nuevo factor de restricción anti-VIH a estudio, o al menos, como un actor importante en la defensa de nuestro organismo contra este patógeno.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

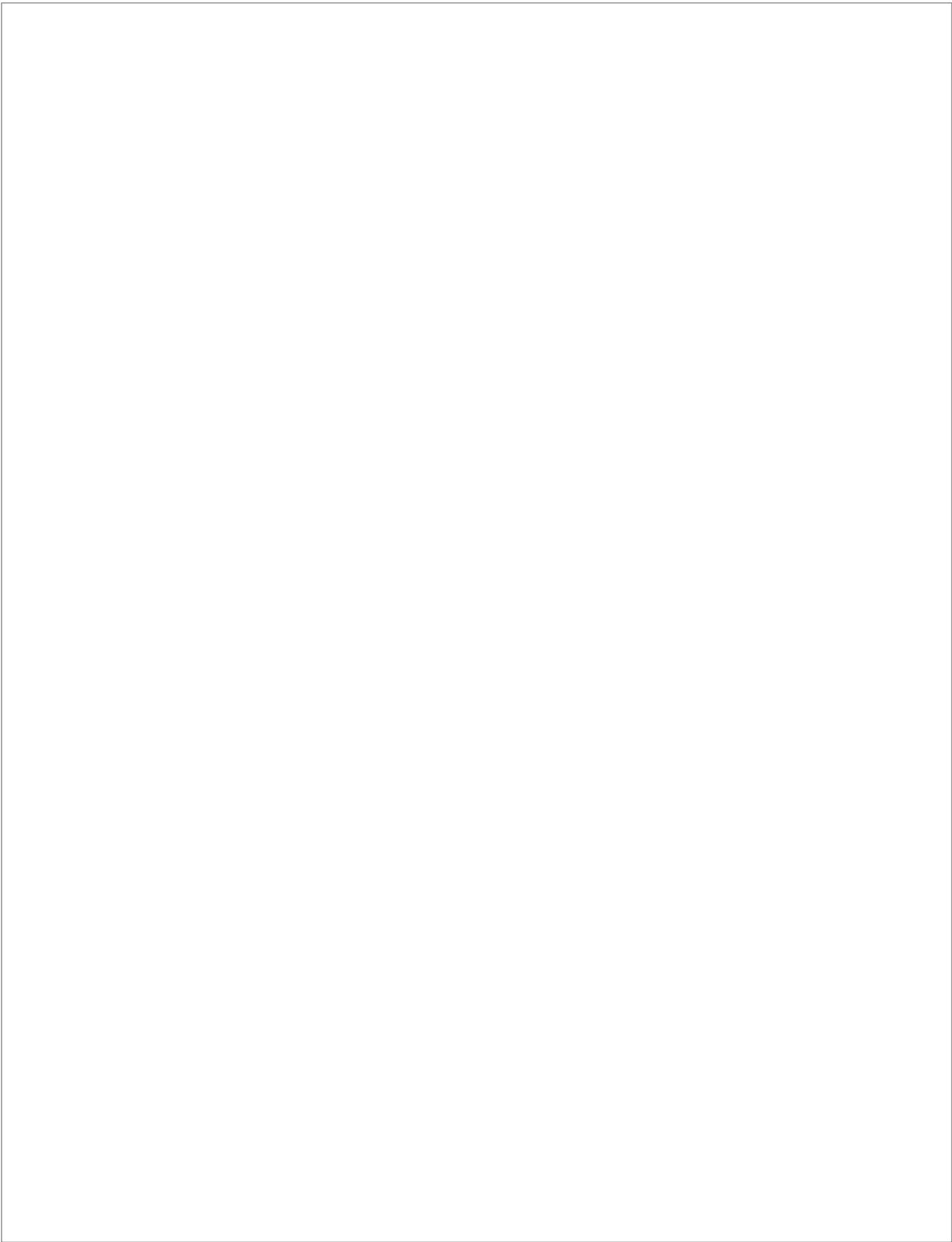
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

# 6

## CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

CONCLUSIONES

HDAC6 promueve la degradación de la proteína viral Vif usando la maquinaria de degradación celular de la autofagia, protegiendo así al factor de restricción celular APOBEC3G y afectando a la patogenicidad del virus:

- HDAC6 no afecta a la estabilidad de APOBEC3G y ambas proteínas interaccionan y co-localizan en la célula de manera constitutiva sin la necesidad de un estímulo externo.
- HDAC6 promueve la degradación de la proteína viral Vif de manera dependiente de su dominio de unión a ubiquitina, BUZ, y de su actividad desacetilasa llevando a la protección del factor de restricción APOBEC3G.
- HDAC6 promueve la degradación de la proteína viral Vif usando la maquinaria autofágica de degradación.
- La degradación de Vif y consecuente protección de APOBEC3G por parte de HDAC6 afecta a la capacidad infecciosa de los virus nacientes.

HDAC6 promueve la degradación de la proteína estructural Pr55-Gag usando la maquinaria de degradación celular de la autofagia, afectando seriamente a un componente esencial de la partícula viral y por tanto a la producción de partículas virales.

- HDAC6 afecta a la estabilidad de la proteína Pr55-Gag pero sin afectar a la capacidad infectiva de los virus debido a esta acción.
- Los dominios desacetilasa y de unión a Ubiquitina de HDAC6 resultan esenciales para la acción de degradación de Pr55-Gag.

- HDAC6 hace uso de la maquinaria de degradación autofágica para inducir la degradación de Pr55-Gag, afectando seriamente la presencia de esta proteína en la célula y la formación de agregados necesarios para la correcta salida y ensamblaje viral.
- La acción pro-degradativa de HDAC6 sobre Pr55-Gag se mantiene en un entorno proviral. La pérdida de capacidad desacetilasa de HDAC6 sí afecta a la capacidad infecciosa de los virus nacientes.
- La ubiquitinación de las regiones NC y SP2 en combinación con la región p6 de la proteína Pr55-Gag resulta indispensable para el reconocimiento por parte de HDAC6.

CONCLUSIONS

HDAC6 promotes the degradation of viral protein Vif using autophagy as pathway of degradation, as result, it achieve the protection of cell restriction factor APOBEC3G affecting the pathogenicity of the virus:

- HDAC6 does not affect the APOBEC3G's stability, and both proteins interact and colocalize without the need for an external stimulus.
- HDAC6 requires its ubiquitin binding domain, BUZ, and its deacetylase activity to promote the degradation of Vif.
- HDAC6 makes use of the autophagic pathway to perform Vif degradation.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

–The degradation of Vif and the consequential protection of APOBEC3G by HDAC6 affects the virus infectious capacity due to the anti-HIV action of APOBEC3G.

HDAC6 promotes the degradation of viral protein Pr55-Gag by the degradation pathway of autophagy, seriously affecting an essential component of the viral particle and therefore, affecting the production of viral particles.

–HDAC6 affects the stability of Pr55-Gag but does not affect the infective capacity of nascent viruses due to this action.

–The deacetylase activity and the ubiquitin binding domains of HDAC6 are essential to promote the degradation of Pr55-Gag.

–HDAC6 makes use of autophagy to achieve the degradation of Pr55-Gag, seriously affecting the steady-state of this protein in the cell and the formation of aggregates, event necessary for the succes viral budding and assembly.

–The pro-degradative action of HDAC6 over Pr55-Gag is preserved in a proviral environment. The deacetylase activity and the ubiquitin binding region, BUZ, are also essential for this action.

–The activity of HDAC6 over Pr55-Gag does not affect the infectivity of nascent viruses, but the loss of deacetylase capacity of HDAC6 decreases the infective capacity of the virus progeny.

–The ubiquitination of NC and SP2 regions in combination with p6 region of the Pr55-Gag protein is indispensable for HDAC6 recognition.

# 7

## BIBLIOGRAFÍA

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

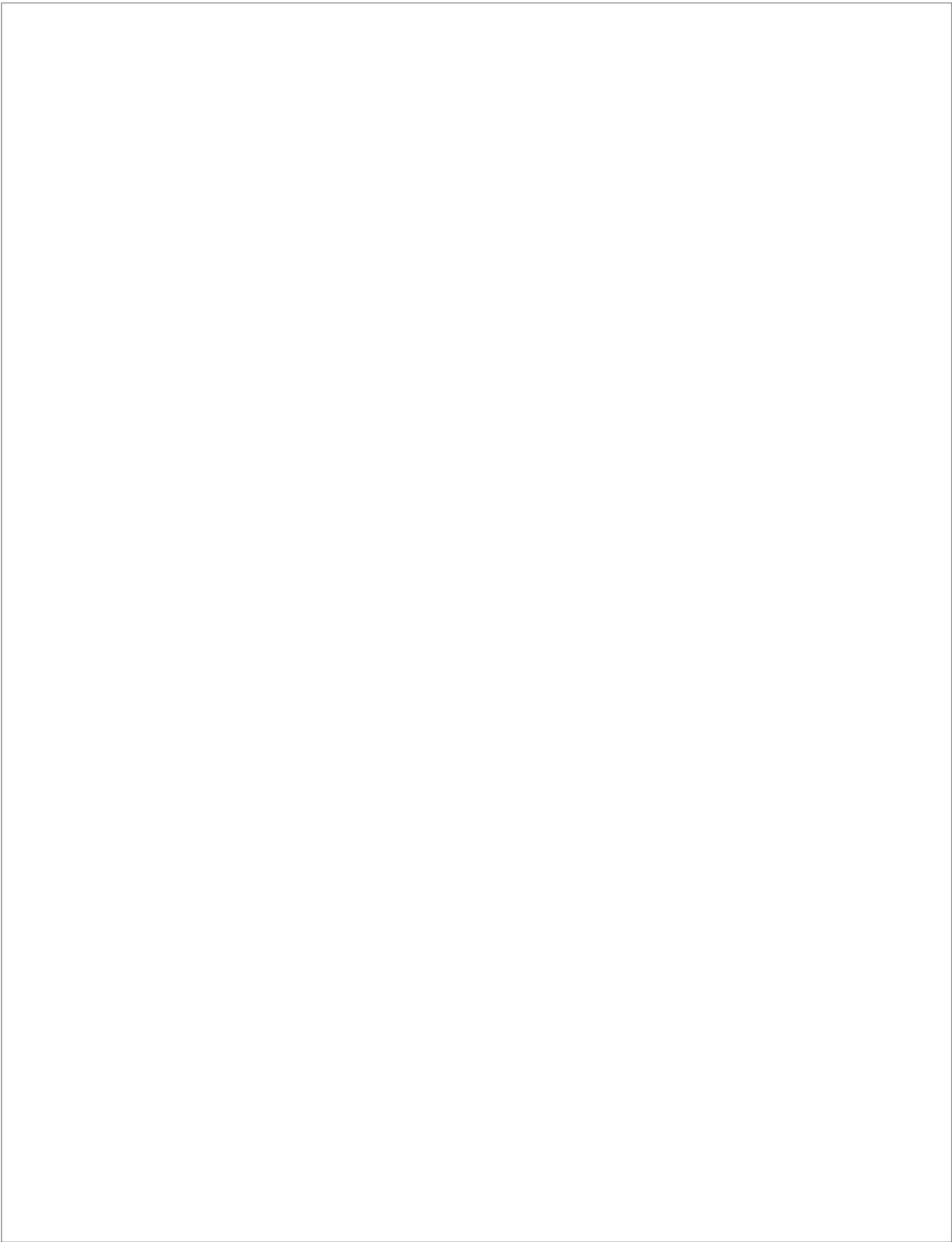
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

1. Centers for Disease Control. Pneumocystis Pneumonia - Los Angeles. Morb Mortal Wkly Rep. 1981
2. Centers for Disease Control (CDC). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York and California. Morb Mortal Wkly Rep. 1981
3. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Me]. 1981
4. CDC. Current trends update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) - United States. Mmwr. 1982
5. Naif HM. Pathogenesis of HIV infection. Infect Dis Rep. 2013
6. Moir S, Chun T-W, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. Annu Rev Pathol. 2011
7. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983
8. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983.
9. Case K. Nomenclature: Human Immunodeficiency Virus. Ann Intern Med. 1986
10. Barin F, Denis F, Allan JS, M'Boup S, Kanki P, Lee TH, et al. Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of West Africa. Lancet. 1985
11. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey M, Santos-Ferreira M, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science. 1986
12. Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. J Gen Virol. 2002
13. Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. Clin Infect Dis. 2011
14. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harb Perspect Med. 2011
15. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. Trends Mol Med. 2012
16. Página Web oficial de la ONU sobre el sida. <http://aidsinfo.unaids.org>

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

17. International Committee on taxonomy of viruses. <http://www.ictvdb.org/virusTaxonomy.asp>
18. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Vol. 381, Nature. 1996
19. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. Science. 1996
20. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. Nature. 1996
21. Berger EA, Doms RW, Fenyo E-M, Korber BTM, Littman DR, Moore JP, et al. A new classification for HIV-1. Nature. 1998
22. Frankel AD, Young JAT. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. Annu Rev Biochem. 1998
23. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. Nat Rev Microbiol. 2012
24. Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. Vol. 2, Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2012.
25. Bour S, Schubert U, Strebel K. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. J Virol. 1995
26. Binette J, Dubé M, Mercier J, Halawani D, Latterich M, Cohen EA. Requirements for the selective degradation of CD4 receptor molecules by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in the endoplasmic reticulum. Retrovirology. 2007
27. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. J Virol. 1992
28. Neil SJD, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. Nature. 2008
29. Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, et al. The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein. Cell Host Microbe. 2008
30. Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, et al. Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells. Cell. 2009

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

31. Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. Nef induces CD4 endocytosis: Requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. 1994
32. Rhee SS, Marsh JW. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. *J Virol*. 1994
33. Chaudhuri R, Lindwasser OW, Smith WJ, Hurley JH, Bonifacino JS. Downregulation of CD4 by human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent on clathrin and involves direct interaction of Nef with the AP2 clathrin adaptor. *J Virol*. 2007
34. Piguet V, Wan L, Borel C, Mangasarian A, Demaurex N, Thomas G, et al. HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nat Cell Biol*. 2000
35. Kasper MR, Collins KL. Nef-mediated disruption of HLA-A2 transport to the cell surface in T cells. *J Virol*. 2003
36. Rosa A, Chande A, Ziglio S, De Sanctis V, Bertorelli R, Goh SL, et al. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature*. 2015
37. Usami Y, Wu Y, Göttlinger HG. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature*. 2015
38. Malim MH, Emerman M. HIV-1 Accessory Proteins-Ensuring Viral Survival in a Hostile Environment. Vol. 3, *Cell Host and Microbe*. 2008
39. Strebel K. HIV accessory proteins versus host restriction factors. Vol. 3, *Current Opinion in Virology*. 2013
40. Harris RS, Hultquist JF, Evans DT. The restriction factors of human immunodeficiency virus. Vol. 287, *Journal of Biological Chemistry*. 2012
41. Lilly F. Susceptibility to two strains of Friend leukemia virus in mice. *Science*. 1967
42. Simon V, Bloch N, Landau NR. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. *Nat Immunol*. 2015
43. Malim MH, Bieniasz PD. HIV restriction factors and mechanisms of evasion. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012
44. Laguette N, Sobhian B, Casartelli N, Ringgaard M, Chable-Bessia C, Ségéral E, et al. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 2011

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

45. Kim B, Nguyen LA, Daddacha W, Hollenbaugh JA. Tight interplay among SAMHD1 protein level, cellular dNTP levels, and HIV-1 proviral DNA synthesis kinetics in human primary monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*. 2012
46. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, et al. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol*. 2012
47. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*. 2004
48. Stremlau M, Perron M, Lee M, Li Y, Song B, Javanbakht H, et al. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006
49. Berthoux L, Sebastian S, Sokolskaja E, Luban J. Cyclophilin A is required for TRIM5  $\alpha$ -mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005
50. Chiu Y-L, Greene WC. APOBEC3G: an intracellular centurion. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009
51. Sova P, Volsky DJ. Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1993
52. Madani N, Kabat D. An Endogenous Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus in Human Lymphocytes Is Overcome by the Viral Vif Protein. *J Virol*. 1998
53. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*. 2002
54. Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J, et al. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics*. 2002
55. Stenglein MD, Matsuo H, Harris RS. Two regions within the amino-terminal half of APOBEC3G cooperate to determine cytoplasmic localization. *J Virol*. 2008
56. Bennett RP, Presnyak V, Wedekind JE, Smith HC. Nuclear exclusion of the HIV-1 host defense factor APOBEC3G requires a novel cytoplasmic retention signal and is not dependent on RNA binding. *J Biol Chem*. 2008
57. Smith HC, Bennett RP, Kizilyer A, McDougall WM, Prohaska KM. Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. Vol. 23, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2012

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

58. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. Vol. 41, Trends in Biochemical Sciences. 2016
59. Conticello SG. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. Genome Biol. 2008
60. Teng B, Burant CF, Davidson NO. Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA editing protein. Science. 1993
61. Chester A, Scott J, Anant S, Navaratnam N. RNA editing: Cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA. Vol. 1494, Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression. 2000
62. Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. Cell. 1987
63. Gee P, Ando Y, Kitayama H, Yamamoto SP, Kanemura Y, Ebina H, et al. APOBEC1-mediated editing and attenuation of herpes simplex virus 1 DNA indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis. J Virol. 2011
64. Bogerd HP, Wiegand HL, Doehle BP, Lueders KK, Cullen BR. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. Nucleic Acids Res. 2006
65. Chen H, Lilley CE, Yu Q, Lee D V., Chou J, Narvaiza I, et al. APOBEC3A is a potent inhibitor of adeno-associated virus and retrotransposons. Curr Biol. 2006
66. Esnault C, Heidmann O, Delebecque F, Dewannieux M, Ribet D, Hance AJ, et al. APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. Nature. 2005
67. Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, et al. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. Nucleic Acids Res. 2007
68. Arias JF, Koyama T, Kinomoto M, Tokunaga K. Retroelements versus APOBEC3 family members: No great escape from the magnificent seven. Vol. 3, Frontiers in Microbiology. 2012.
69. Sawyer SL, Emerman M, Malik HS. Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA-editing enzyme APOBEC3G. PLoS Biol. 2004
70. OhAinle M, Kerns JA, Malik HS, Emerman M. Adaptive evolution and antiviral activity of the conserved mammalian cytidine deaminase APOBEC3H. J Virol. 2006
71. Schumann GG. APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against LINE-1-mediated retrotransposition. Biochem Soc Trans. 2007

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

72. Koning F a., Goujon C, Bauby H, Malim MH. Target Cell-Mediated Editing of HIV-1 cDNA by APOBEC3 Proteins in Human Macrophages. *J Virol.* 2011
73. Doehle BP, Schäfer A, Cullen BR. Human APOBEC3B is a potent inhibitor of HIV-1 infectivity and is resistant to HIV-1 Vif. *Virology.* 2005
74. Dang Y, Wang X, Esselman WJ, Zheng Y-H. Identification of APOBEC3DE as another antiretroviral factor from the human APOBEC family. *J Virol.* 2006
75. Holmes RK, Koning FA, Bishop KN, Malim MH. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation: Comparisons with APOBEC3G. *J Biol Chem.* 2007
76. Hultquist JF, Lengyel JA, Refsland EW, LaRue RS, Lackey L, Brown WL, et al. Human and rhesus APOBEC3D, APOBEC3F, APOBEC3G, and APOBEC3H demonstrate a conserved capacity to restrict Vif-deficient HIV-1. *J Virol.* 2011
77. Zheng Y-H, Irwin D, Kurosu T, Tokunaga K, Sata T, Peterlin BM. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol.* 2004
78. Wiegand HL, Doehle BP, Bogerd HP, Cullen BR. A second human antiretroviral factor, APOBEC3F, is suppressed by the HIV-1 and HIV-2 Vif proteins. *EMBO J.* 2004
79. Cen S, Guo F, Niu M, Saadatmand J, Deflassieux J, Kleiman L. The interaction between HIV-1 gag and APOBEC3G. *J Biol Chem.* 2004
80. Alce TM, Popik W. APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 gag nucleocapsid protein. *J Biol Chem.* 2004
81. Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arunachalam SC, Gao L. The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature.* 2003
82. Lecossier D, Bouchonnet F, Clavel F, Hance AJ. Hypermutation of HIV-1 DNA in the Absence of the Vif Protein. *Science.* 2003
83. Yu Q, König R, Pillai S, Chiles K, Kearney M, Palmer S, et al. Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat Struct Mol Biol.* 2004
84. Lindahl T. Quality Control by DNA Repair. *Science.* 1999
85. Pearl LH. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. Vol. 460, *Mutation Research - DNA Repair.* 2000.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

86. Mansky LM, Preveral S, Selig L, Benarous R, Benichou S. The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *J Virol*. 2000
87. Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad Antiretroviral Defence by Human APOBEC3G Through Lethal Editing of Nascent Reverse Transcripts. *Nature*. 2004
88. Mbisa JL, Barr R, Thomas JA, Vandegraaff N, Dorweiler IJ, Svarovskaia ES, et al. Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *J Virol*. 2007
89. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN, et al. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*. 2003
90. Jin X, Wu H, Smith H. APOBEC3G levels predict rates of progression to AIDS. *Retrovirology*. 2007
91. Jin X, Brooks A, Chen H, Bennett R, Reichman R, Smith H. APOBEC3G/CEM15 (hA3G) mRNA levels associate inversely with human immunodeficiency virus viremia. *J Virol*. 2005
92. Biasin M, Piacentini L, Lo Caputo S, Kanari Y, Magri G, Trabattoni D, et al. Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G: a possible role in the resistance to HIV of HIV-exposed seronegative individuals. *J Infect Dis*. 2007
93. Sadler HA, Stenglein MD, Harris RS, Mansky LM. APOBEC3G Contributes to HIV-1 Variation through Sublethal Mutagenesis. *J Virol*. 2010
94. Pace C, Keller J, Nolan D, James I, Gaudieri S, Moore C, et al. Population level analysis of human immunodeficiency virus type 1 hypermutation and its relationship with APOBEC3G and vif genetic variation. *J Virol*. 2006
95. Jern P, Russell RA, Pathak VK, Coffin JM. Likely role of APOBEC3G-mediated G-to-A mutations in HIV-1 evolution and drug resistance. *PLoS Pathog*. 2009
96. Shindo K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Abudu A, Fukunaga K, Uchiyama T. The Enzymatic Activity of CEM15/Apobec-3G Is Essential for the Regulation of the Infectivity of HIV-1 Virion but Not a Sole Determinant of Its Antiviral Activity. *J Biol Chem*. 2003
97. Newman ENC, Holmes RK, Craig HM, Klein KC, Lingappa JR, Malim MH, et al. Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol*. 2005
98. Luo K, Wang T, Liu B, Tian C, Xiao Z, Kappes J, et al. Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol*. 2007

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

99. Iwatani Y, Chan DSB, Wang F, Maynard KS, Sugiura W, Gronenborn AM, et al. Deaminase-independent inhibition of HIV-1 reverse transcription by APOBEC3G. *Nucleic Acids Res.* 2007
100. Browne EP, Littman DR. Species-specific restriction of apobec3-mediated hypermutation. *J Virol.* 2008
101. Zhang J, Webb DM. Rapid evolution of primate antiviral enzyme APOBEC3G. *Hum Mol Genet.* 2004
102. Zielonka J, Bravo IG, Marino D, Conrad E, Perković M, Battenberg M, et al. Restriction of equine infectious anemia virus by equine APOBEC3 cytidine deaminases. *J Virol.* 2009
103. Andrew A, Strebel K. HIV-1 accessory proteins: Vpu and Vif. *Methods Mol Biol.* 2014
104. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol.* 1999
105. Blanc D, Patience C, Schulz TF, Weiss R, Spire B. Transcomplementation of VIF- HIV-1 mutants in CEM cells suggests that VIF affects late steps of the viral life cycle. *Virology.* 1993
106. Borman A, Quillent C, Charneau P, Dauguet C, Clavel F. Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *J Virol.* 1995
107. Lake JA, Carr J, Feng F, Mundy L, Burrell C, Li P. The role of Vif during HIV-1 infection: Interaction with novel host cellular factors. *J Clin Virol.* 2003
108. Oberste MS, Gonda M a. Conservation of amino-acid sequence motifs in lentivirus Vif proteins. *Virus Genes.* 1992
109. Desrosiers RC, Lifson JD, Gibbs JS, Czajak SC, Howe a Y, Arthur LO, et al. Identification of highly attenuated mutants of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* 1998
110. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, Tartar A, Portetelle D, Burny A, et al. Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with sor gene deletions. *Science.* 1986
111. Kan NC, Franchini G, Wong SF, DuBois GC, Robey WG, Lautenberger JA, et al. Identification of HTLV-III/LAV sor gene product and detection of antibodies in human sera. *Science.* 1986
112. Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, Terwilliger E, Dorfman T, Haseltine WA, et al. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol.* 1992
113. Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin M a. The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature.* 1987

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

114. Wolfe LS, Stanley BJ, Liu C, Eliason WK, Xiong Y. Dissection of the HIV Vif interaction with human E3 ubiquitin ligase. *J Virol*. 2010
115. Guo Y, Dong L, Qiu X, Wang Y, Zhang B, Liu H, et al. Structural basis for hijacking CBF- $\beta$  and CUL5 E3 ligase complex by HIV-1 Vif. *Nature*. 2014
116. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P, et al. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*. 2003
117. Mehle A, Goncalves J, Santa-Marta M, McPike M, Gabuzda D. Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-Cul5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev*. 2004
118. Kobayashi M, Takaori-Kondo A, Miyauchi Y, Iwai K, Uchiyama T. Ubiquitination of APOBEC3G by an HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C complex is essential for Vif function. *J Biol Chem*. 2005
119. Dussart S, Courcoul M, Bessou G, Douaisi M, Duverger Y, Vigne R, et al. The Vif protein of human immunodeficiency virus type 1 is posttranslationally modified by ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004
120. Feng Y, Baig TT, Love RP, Chelico L. Suppression of APOBEC3-mediated restriction of HIV-1 by Vif. *Front Microbiol*. 2014
121. Kitamura S, Ode H, Nakashima M, Imahashi M, Naganawa Y, Kurosawa T, et al. The APOBEC3C crystal structure and the interface for HIV-1 Vif binding. *Nat Struct Mol Biol*. 2012
122. Li MMH, Wu LI, Emerman M. The range of human APOBEC3H sensitivity to lentiviral Vif proteins. *J Virol*. 2010
123. Wissing S, Galloway NLK, Greene WC. HIV-1 Vif versus the APOBEC3 cytidine deaminases: An intracellular duel between pathogen and host restriction factors. Vol. 31, *Molecular Aspects of Medicine*. 2010
124. Stopak K, De Noronha C, Yonemoto W, Greene WC. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell*. 2003
125. Mercenne G, Bernacchi S, Richer D, Bec G, Henriot S, Paillart JC, et al. HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res*. 2009
126. Parker R, Sheth U. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. Vol. 25, *Molecular Cell*. 2007

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

127. Marin M, Golem S, Rose KM, Kozak SL, Kabat D. Human immunodeficiency virus type 1 Vif functionally interacts with diverse APOBEC3 cytidine deaminases and moves with them between cytoplasmic sites of mRNA metabolism. *J Virol.* 2008
128. Opi S, Kao S, Goila-Gaur R, Khan MA, Miyagi E, Takeuchi H, et al. Vif inhibits packaging and antiviral activity of A3G. *J Virol.* 2007
129. Gallois-Montbrun S, Kramer B, Swanson CM, Byers H, Lynham S, Ward M, et al. Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol.* 2007
130. Kreisberg JF, Yonemoto W, Greene WC. Endogenous factors enhance HIV infection of tissue naive CD4 T cells by stimulating high molecular mass APOBEC3G complex formation. *J Exp Med.* 2006
131. Soros VB, Yonemoto W, Greene WC. Newly synthesized APOBEC3G is incorporated into HIV virions, inhibited by HIV RNA, and subsequently activated by RNase H. *PLoS Pathog.* 2007
132. Goila-Gaur R, Khan MA, Miyagi E, Kao S, Opi S, Takeuchi H, et al. HIV-1 Vif promotes the formation of high molecular mass APOBEC3G complexes. *Virology.* 2008
133. Simon JH, Carpenter EA, Fouchier RA, Malim MH. Vif and the p55(Gag) polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 are present in colocalizing membrane-free cytoplasmic complexes. *J Virol.* 1999
134. Fouchier RA, Simon JH, Jaffe AB, Malim MH. Human immunodeficiency virus type 1 Vif does not influence expression or virion incorporation of gag-, pol-, and env-encoded proteins. *J Virol.* 1996
135. Friedler A, Zakai N, Karni O, Friedler D, Gilon C, Loyter A. Identification of a nuclear transport inhibitory signal (NTIS) in the basic domain of HIV-1 Vif protein. *J Mol Biol.* 1999
136. Farrow M a, Somasundaran M, Zhang C, Gabuzda D, Sullivan JL, Greenough TC. Nuclear localization of HIV type 1 Vif isolated from a long-term asymptomatic individual and potential role in virus attenuation. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005
137. Bardy M, Gay B, Pébernard S, Chazal N, Courcou M, Vigne R, et al. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Vif with Gag and Gag-Pol Precursors: Co-encapsidation and interference with viral protease-mediated Gag processing. *J Gen Virol.* 2001
138. Höglund S, Ohagen A, Lawrence K, Gabuzda D. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology.* 1994

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

139. Sakai H, Shibata R, Sakuragi J, Sakuragi S, Kawamura M, Adachi A. Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 Vif protein for maturation of virus particles. *J Virol.* 1993
140. Ohagen A, Gabuzda D. Role of Vif in stability of the human immunodeficiency virus type 1 core. *JV.* 2000
141. Syed F, McCrae MA. Interactions in vivo between the Vif Protein of HIV-1 and the precursor (Pr55GAG) of the virion nucleocapsid proteins. *Arch Virol.* 2009
142. Bouyac M, Courcoul M, Bertoia G, Baudat Y, Gabuzda D, Blanc D, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein binds to the Pr55Gag precursor. *J Virol.* 1997
143. Camaur D, Trono D. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol.* 1996
144. Huvent I, Hong SS, Fournier C, Gay B, Tournier J, Carrière C, et al. Interaction and co-encapsidation of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Vif recombinant proteins. *J Gen Virol.* 1998
145. Akari H, Fujita M, Kao S, Khan MA, Shehu-Xhilaga M, Adachi A, et al. High Level Expression of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Vif Inhibits Viral Infectivity by Modulating Proteolytic Processing of the Gag Precursor at the p2/Nucleocapsid Processing Site. *J Biol Chem.* 2004
146. Fujita M, Akari H, Sakurai A, Yoshida A, Chiba T, Tanaka K, et al. Expression of HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome degradation. *Microbes Infect.* 2004.
147. Kolesnitchenko V, Wahl LM, Tian H, Sunila I, Tani Y, Hartmann DP, et al. Human immunodeficiency virus 1 envelope-initiated G2-phase programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995
148. Sakai K, Dimas J, Lenardo MJ. The Vif and Vpr accessory proteins independently cause HIV-1-induced T cell cytopathicity and cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006
149. Wang J, Shackelford JM, Casella CR, Shivers DK, Rapaport EL, Liu B, et al. The Vif accessory protein alters the cell cycle of human immunodeficiency virus type 1 infected cells. *Virology.* 2007
150. Andersen JL, Le Rouzic E, Planelles V. HIV-1 Vpr: Mechanisms of G2 arrest and apoptosis. Vol. 85, *Experimental and Molecular Pathology.* 2008

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

151. Izumi T, Ito K, Matsui M, Shirakawa K, Shinohara M, Nagai Y, et al. HIV-1 viral infectivity factor interacts with TP53 to induce G2 cell cycle arrest and positively regulate viral replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010
152. Alexander L, Aquino-DeJesus MJ, Chan M, Andiman WA. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by a two-amino-acid insertion in HIV-1 Vif from a nonprogressing mother and child. *J Virol*. 2002
153. Kishi M, Nishino Y, Sumiya M, Ohki K, Kimura T, Goto T, et al. Cells surviving infection by human immunodeficiency virus type 1: vif or vpu mutants produce non-infectious or markedly less cytopathic viruses. *J Gen Virol*. 1992
154. Sakai K, Ma XY, Gordienko I, Volsky DJ. Recombinational analysis of a natural noncytopathic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate: role of the vif gene in HIV-1 infection kinetics and cytopathicity. *J Virol*. 1991
155. Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M, Thines D, et al. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*. 1989
156. Speth C, Bredl S, Hagleitner M, Wild J, Dierich M, Wolf H, et al. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Pr55gag virus-like particles are potent activators of human monocytes. *Virology*. 2008
157. Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Martínez M, Blanco J, Gòdia F, Segura MM. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *J Biotechnol*. 2013
158. Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 1998
159. Bell NM, Lever AML. HIV Gag polyprotein: Processing and early viral particle assembly. Vol. 21, *Trends in Microbiology*. 2013
160. Campbell SM, Crowe SM, Mak J. Lipid rafts and HIV-1: From viral entry to assembly of progeny virions. In: *Journal of Clinical Virology*. 2001
161. Hogue IB, Grover JR, Soheilian F, Nagashima K, Ono A. Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane. *J Virol*. 2011
162. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI. The structural biology of HIV assembly. Vol. 18, *Current Opinion in Structural Biology*. 2008
163. Morita E, Sundquist WI. RETROVIRUS BUDDING. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

164. Garrus JE, Von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, Wang HE, et al. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*. 2001
165. VerPlank L, Bouamr F, LaGrassa TJ, Agresta B, Kikonyogo A, Leis J, et al. Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001
166. Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Baci Hamilton I, Sundquist WI. ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host Microbe*. 2011
167. Tavassoli A, Lu Q, Gam J, Pan H, Benkovic SJ, Cohen SN. Inhibition of HIV budding by a genetically selected cyclic peptide targeting the Gag-TSG101 interaction. *ACS Chem Biol*. 2008
168. Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD. Role of ESCRT-I in retroviral budding. Vol. 77, *Journal of virology*. 2003
169. Stuchell MD, Garrus JE, Müller B, Stray KM, Ghaffarian S, McKinnon R, et al. The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem*. 2004
170. Votteler J, Sundquist WI. Virus budding and the ESCRT pathway. Vol. 14, *Cell Host and Microbe*. 2013
171. Ott DE, Coren L V, Chertova EN, Gagliardi TD, Schubert U. Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology*. 2000
172. Ott DE, Coren L V., Copeland TD, Kane BP, Johnson DG, Sowder RC, et al. Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J Virol*. 1998
173. Sette P, Nagashima K, Piper RC, Bouamr F. Ubiquitin conjugation to Gag is essential for ESCRT-mediated HIV-1 budding. *Retrovirology*. 2013
174. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*. 2001
175. Jäger S, Gottwein E, Kräusslich H-G. Ubiquitination of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Is Highly Dependent on Gag Membrane Association . *J Virol*. 2007

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

176. Schubert U, Ott DE, Chertova EN, Welker R, Tessmer U, Princiotta MF, et al. Proteasome inhibition interferes with Gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000
177. Ott DE, Coren L V, Sowder li RC, Adams J, Schubert U. Retroviruses Have Differing Requirements for Proteasome Function in the Budding Process. *J Virol*. 2003
178. Patnaik A, Chau V, Wills JW. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000
179. Strack B, Calistri A, Gottlinger HG. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J Virol*. 2002
180. Martin-serrano J, Perez-caballero D, Bieniasz PD. Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J Virol*. 2004
181. Gottwein E, Krausslich HG. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination. *J Virol*. 2005
182. Gottwein E, Jäger S, Habermann A, Kräusslich H-G. Cumulative mutations of ubiquitin acceptor sites in human immunodeficiency virus type 1 gag cause a late budding defect. *J Virol*. 2006
183. Valenzuela-Fernández A, Alvarez S, Gordon-Alonso M, Barrero M, Ursa A, Cabrero JR, et al. Histone deacetylase 6 regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. *Mol Biol Cell*. 2005
184. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000.
185. Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2002
186. Hübner MR, Eckersley-Maslin MA, Spector DL. Chromatin organization and transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2013
187. Peterson CL, Lanier M-A. Histones and histone modifications. *Curr Biol*. 2004
188. Wade P a. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. Vol. 10, *Human molecular genetics*. 2001
189. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*. 2009
190. de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. 2003

---

174

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

191. Bertos NR, Wang AH, Yang XJ. Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol.* 2001
192. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res.* 2007
193. Verdel A, Khochbin S. Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases: Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem.* 1999
194. Grozinger CM, Hassig C a, Schreiber SL. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999
195. Bertos NR, Gilquin B, Chan GKT, Yen TJ, Khochbin S, Yang XJ. Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem.* 2004
196. Zou H, Wu Y, Navre M, Sang BC. Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006
197. Zhang Y, Gilquin B, Khochbin S, Matthias P. Two catalytic domains are required for protein deacetylation. *J Biol Chem.* 2006
198. Seigneurin-Berny D, Verdel A, Curtet S, Lemerrier C, Garin J, Rousseaux S, et al. Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 2001
199. Pai MT, Tzeng SR, Kovacs JJ, Keaton MA, Li SSC, Yao TP, et al. Solution Structure of the Ubp-M BUZ Domain, a Highly Specific Protein Module that Recognizes the C-terminal Tail of Free Ubiquitin. *J Mol Biol.* 2007
200. Hard RL, Liu J, Shen J, Zhou P, Pei D. HDAC6 and Ubp-M BUZ domains recognize specific C-terminal sequences of proteins. *Biochemistry.* 2010
201. Hook SS, Orian A, Cowley SM, Eisenman RN. Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002
202. Kovacs JJ, Murphy PJM, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta C V., et al. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell.* 2005
203. Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: A novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem.* 2005

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

204. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 2002
205. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*. 2003
206. Ouyang H, Ali YO, Ravichandran M, Dong A, Qiu W, MacKenzie F, et al. Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini. *J Biol Chem*. 2012
207. Fusco C, Micale L, Augello B, Mandriani B, Pellico MT, De Nittis P, et al. HDAC6 mediates the acetylation of TRIM50. *Cell Signal*. 2014
208. Sorokin A V, Kim ER, Ovchinnikov LP. Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochem Biokhimiā*. 2009
209. Plemper RK, Wolf DH. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. Vol. 24, *Trends in Biochemical Sciences*. 1999
210. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: A cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*. 1998
211. Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, et al. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J*. 2003
212. Li L, Yang XJ. Tubulin acetylation: Responsible enzymes, biological functions and human diseases. Vol. 72, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015
213. Maruta H, Greer K, Rosenbaum JL. The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol*. 1986
214. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelières FP, King SJ, Humbert S, et al. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci*. 2007
215. Kwon S, Zhang Y, Matthias P. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev*. 2007
216. Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated Huntingtin. *J Biol Chem*. 2005

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

217. Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao TP. Disease-causing mutations in Parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol.* 2010
218. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, et al. HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Mol Cell.* 2007.
219. Ashford TP, Porter KR. CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES. *J Cell Biol.* 1962
220. Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014
221. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. Vol. 147, *Cell.* 2011
222. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007
223. Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* 2012
224. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. Vol. 7, *Autophagy.* 2011
225. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. Vol. 34, *Molecular Cell.* 2009
226. Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of Selective Autophagy. Vol. 428, *Journal of Molecular Biology.* 2016
227. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome Formation in Mammalian Cells. *CELL Struct Funct.* 2002
228. Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol.* 2010
229. Mizushima N. Autophagy: Process and function. Vol. 21, *Genes and Development.* 2007
230. Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. Vol. 1, *Autophagy.* 2005
231. Klionsky DJ, Eskelinen EL, Deretic V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. Vol. 10, *Autophagy.* 2014
232. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. Vol. 462, *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2007

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

233. Deretic V, Delgado M, Vergne I, Master S, De Haro S, Ponpuak M, et al. Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: A model system to dissect immunological roles of autophagy. Vol. 335, Current Topics in Microbiology and Immunology. 2009
234. Nixon R. The role of autophagy in neurodegenerative disease. Nat Med. 2013
235. Wileman T. Autophagy as a defence against intracellular pathogens. Autophagy Mol Mech. 2013
236. Yao T-P. The role of ubiquitin in autophagy-dependent protein aggregate processing. Genes Cancer. 2010
237. Wileman T. Aggresomes and pericentriolar sites of virus assembly: Cellular defense or viral design? Annu Rev Microbiol. 2007
238. Wileman T. Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. Science. 2006
239. Kudchodkar SB, Levine B. Viruses and autophagy. Vol. 19, Reviews in Medical Virology. 2009
240. Sumpster R, Levine B. Selective autophagy and viruses. Vol. 7, Autophagy. 2011
241. Richards AL, Jackson WT. How positive-strand RNA viruses benefit from autophagosome maturation. J Virol. 2013
242. Banerjee I, Miyake Y, Nobs SP, Schneider C, Horvath P, Kopf M, et al. Influenza A virus uses the aggresome processing machinery for host cell entry. Science. 2014
243. de Armas-Rillo L, Valera M-S, Marrero-Hernández S, Valenzuela-Fernández A. Membrane dynamics associated with viral infection. Rev Med Virol. 2016
244. Dinkins C, Pilli M, Kehrl JH. Roles of autophagy in HIV infection. Immunol Cell Biol. 2015
245. Boyault C, Zhang Y, Fritah S, Caron C, Gilquin B, So HK, et al. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. Genes Dev. 2007
246. Lee J-Y, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao Y-S, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. EMBO J. 2010
247. Liu KP, Zhou D, Ouyang DY, Xu LH, Wang Y, Wang LX, et al. LC3B-II deacetylation by histone deacetylase 6 is involved in serum-starvation-induced autophagic degradation. Biochem Biophys Res Commun. 2013
248. Cabrero JR, Serrador JM, Barreiro O, Mittelbrunn M, Naranjo-Suárez S, Martín-Cófreces N, et al. Lymphocyte chemotaxis is regulated by histone deacetylase 6, independently of its deacetylase activity. Mol Biol Cell. 2006

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

249. Li Y, Shin D, Kwon SH. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. Vol. 280, FEBS Journal. 2013
250. Seidel C, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Histone deacetylase 6 in health and disease. Vol. 7, Epigenomics. 2015
251. Valenzuela-Fernández A, Cabrero JR, Serrador JM, Sánchez-Madrid F. HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. Vol. 18, Trends in Cell Biology. 2008
252. Malinowsky K, Luksza J, Dittmar MT. Susceptibility to virus-cell fusion at the plasma membrane is reduced through expression of HIV gp41 cytoplasmic domains. Virology. 2008
253. Zhang L, Ogden A, Aneja R, Zhou J. Diverse roles of HDAC6 in viral infection: Implications for antiviral therapy. Pharmacol Ther. 2016
254. Huo L, Li D, Sun X, Shi X, Karna P, Yang W, et al. Regulation of Tat acetylation and transactivation activity by the microtubule-associated deacetylase HDAC6. J Biol Chem. 2011
255. Martin KL, Johnson M, D'Aquila RT. APOBEC3G Complexes Decrease Human Immunodeficiency Virus Type 1 Production. J Virol. 2011
256. Opi S, Kao S, Goila-Gaur R, Khan M a, Miyagi E, Takeuchi H, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits packaging and antiviral activity of a degradation-resistant APOBEC3G variant. J Virol. 2007
257. Opi S, Takeuchi H, Kao S, Khan M a, Miyagi E, Goila-Gaur R, et al. Monomeric APOBEC3G is catalytically active and has antiviral activity. J Virol. 2006
258. Batisse J, Guerrero S, Bernacchi S, Sleiman D, Gabus C, Darlix JL, et al. The role of Vif oligomerization and RNA chaperone activity in HIV-1 replication. Virus Res. 2012
259. Langer S, Sauter D. Unusual Fusion Proteins of HIV-1. Front Microbiol. 2016
260. Telenti A. Adaptation, co-evolution, and human susceptibility to HIV-1 infection. Vol. 5, Infection, Genetics and Evolution. 2005
261. Rebhandl S, Huemer M, Greil R, Geisberger R. AID/APOBEC deaminases and cancer. Oncoscience. 2015
262. Ding Q, Chang CJ, Xie X, Xia W, Yang JY, Wang SC, et al. APOBEC3G promotes liver metastasis in an orthotopic mouse model of colorectal cancer and predicts human hepatic metastasis. J Clin Invest. 2011

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

263. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*. 2007
264. Su M, Guan H, Zhang F, Gao Y, Teng X, Yang W. HDAC6 Regulates the Chaperone-Mediated Autophagy to Prevent Oxidative Damage in Injured Neurons after Experimental Spinal Cord Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2016
265. Okatsu K, Saisho K, Shimanuki M, Nakada K, Shitara H, Sou Y, et al. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes to Cells*. 2010
266. Yan J. Interplay between HDAC6 and its interacting partners: essential roles in the aggresome-autophagy pathway and neurodegenerative diseases. *DNA Cell Biol*. 2014
267. Serrador JM, Cabrero JR, Sancho D, Mittelbrunn M, Urzainqui A, Sánchez-Madrid F. HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity*. 2004
268. Ran J, Yang Y, Li D, Liu M, Zhou J. Deacetylation of  $\alpha$ -tubulin and cortactin is required for HDAC6 to trigger ciliary disassembly. *Sci Rep*. 2015
269. Kaluza D, Kroll J, Gesierich S, Yao TP, Boon RA, Hergenreider E, et al. Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin. *EMBO J*. 2011
270. Nuñez N, Iborra S, Trullo A, Moreno-gonzalo O, Calvo E, Catala E, et al. HDAC6 regulates the dynamics of lytic granules in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Sci*. 2016
271. Nunez-Andrade N, Sanchez-Madrid F, Martin-Cofreces NB. HDAC6 is a Regulator of CTL Function through Control of Lytic Granule Dynamics. *Single cell Biol*. 2016
272. Leyk J, Goldbaum O, Noack M, Richter-Landsberg C. Inhibition of HDAC6 Modifies Tau Inclusion Body Formation and Impairs Autophagic Clearance. *J Mol Neurosci*. 2015
273. Odagiri S, Tanji K, Mori F, Miki Y, Kakita A, Takahashi H, et al. Brain expression level and activity of HDAC6 protein in neurodegenerative dementia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013
274. Zhang L, Sheng S, Qin C. The role of HDAC6 in Alzheimer's disease. Vol. 33, *Journal of Alzheimer's Disease*. 2013
275. Miki Y, Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Accumulation of histone deacetylase 6, an aggresome-related protein, is specific to Lewy bodies and glial cytoplasmic inclusions. *Neuropathology*. 2011

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

276. Parmigiani RB, Xu WS, Venta-Perez G, Erdjument-Bromage H, Yaneva M, Tempst P, et al. HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci*. 2008
277. Decker CJ, Parker R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. Vol. 4, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012.
278. Jung KH, Noh JH, Kim JK, Eun JW, Bae HJ, Chang YG, et al. Histone deacetylase 6 functions as a tumor suppressor by activating c-Jun NH2-terminal kinase-mediated beclin 1-dependent autophagic cell death in liver cancer. *Hepatology*. 2012
279. Powers JJ, Maharaj KK, Sahakian E, Xing L, PerezVillarroel P, Knox T, et al. Histone Deacetylase 6 (HDAC6) As a Regulator of Immune Check-Point Molecules in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Blood*. 2014
280. Husain M, Cheung C-Y. Histone deacetylase 6 inhibits influenza A virus release by downregulating the trafficking of viral components to the plasma membrane via its substrate, acetylated microtubules. *J Virol*. 2014
281. Sabo Y, Walsh D, Barry DS, Tinaztepe S, De Los Santos K, Goff SP, et al. HIV-1 induces the formation of stable microtubules to enhance early infection. *Cell Host Microbe*. 2013
282. Malinowska M, Niedźwiedzka-Rystwej P, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Stress granules (SG) and processing bodies (PB) in viral infections. Vol. 63, *Acta Biochimica Polonica*. 2016
283. Chiu Y-L. Biochemical fractionation and purification of high-molecular-mass APOBEC3G complexes. *Methods Mol Biol*. 2011
284. Chiu Y-L, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature*. 2005
285. Chiu Y-L, Witkowska HE, Hall SC, Santiago M, Soros VB, Esnault C, et al. High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006
286. Huthoff H, Malim MH. Identification of amino acid residues in APOBEC3G required for regulation by human immunodeficiency virus type 1 Vif and Virion encapsidation. *J Virol*. 2007
287. Schröfelbauer B, Chen D, Landau NR. A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004
288. Xu H, Svarovskaia ES, Barr R, Zhang Y, Khan MA, Strebler K, et al. A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

289. Matsui Y, Shindo K, Nagata K, Yoshinaga N, Shirakawa K, Kobayashi M, et al. Core Binding Factor beta Protects Human Immunodeficiency Virus Type 1 Accessory Protein Viral Infectivity Factor from MDM2-Mediated Degradation. *J Biol Chem*. 2016
290. Zhang W, Du J, Evans SL, Yu Y, Yu X-F. T-cell differentiation factor CBF- $\beta$  regulates HIV-1 Vif-mediated evasion of host restriction. *Nature*. 2012
291. Jäger S, Kim DY, Hultquist JF, Shindo K, LaRue RS, Kwon E, et al. Vif hijacks CBF- $\beta$  to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature*. 2012
292. Dussart S, Courcoul M, Bessou G, Douaisi M, Duverger Y, Vigne R, et al. The Vif protein of human immunodeficiency virus type 1 is posttranslationally modified by ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004
293. Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Ito K, et al. MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology*. 2009
294. Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, Gabuzda D. Vif Overcomes the Innate Antiviral Activity of APOBEC3G by Promoting Its Degradation in the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J Biol Chem*. 2004
295. Protein Atlas, Tissue expression of HDAC6. <http://www.proteinatlas.org>
296. Bedford L, Paine S, Sheppard PW, Mayer RJ, Roelofs J. Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. Vol. 20, *Trends in Cell Biology*. 2010
297. Dang Y, Lai MS, Zheng YH. APOBEC3G is degraded by the proteasomal pathway in a vif-dependent manner without being polyubiquitylated. *J Biol Chem*. 2008
298. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Vol. 1833, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2013
299. Vanden Berghe T, Kaiser WJ, Bertrand MJ, Vandenabeele P. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Mol Cell Oncol*. 2015
300. Antonucci L, Fagman JB, Kim JY, Todoric J, Gukovsky I, Mackey M, et al. Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress. *Proc Natl Acad Sci*. 2015
301. Eskelinen E-L, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Act*. 2009

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

302. Musiwaro P, Smith M, Manifava M, Walker SA, Ktistakis NT. Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy*. 2013
303. Bánréti Á, Sass M, Graba Y. The emerging role of acetylation in the regulation of autophagy. *Autophagy*. 2013
304. Delchambre M, Gheysen D, Thines D, Thiriart C, Jacobs E, Verdin E, et al. The GAG precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J*. 1989
305. Mergener K, Facke M, Welker R, Brinkmann V, Gelderblom HR, Krausslich HG. Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells. *Virology*. 1992
306. Carlson L-A, Briggs JAG, Glass B, Riches JD, Simon MN, Johnson MC, et al. Three-Dimensional Analysis of Budding Sites and Released Virus Suggests a Revised Model for HIV-1 Morphogenesis. *Cell Host Microbe*. 2008
307. Carlson LA, de Marco A, Oberwinkler H, Habermann A, Briggs JAG, Kräusslich HG, et al. Cryo electron tomography of native HIV-1 budding sites. *PLoS Pathog*. 2010
308. Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol*. 1990
309. Ross EK, Fuerst TR, Orenstein JM, O'Neill T, Martin MA, Venkatesan S. Maturation of Human Immunodeficiency Virus Particles Assembled from the gag Precursor Protein Requires In Situ Processing by gag-pol Protease. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1991
310. Welker R, Hohenberg H, Tessmer U, Huckhagel C, Kräusslich HG. Biochemical and structural analysis of isolated mature cores of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2000
311. Alfidhli A, Dhenub TC, Still A, Barklis E. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag dimerization-induced assembly. *J Virol*. 2005
312. Scarlata S, Carter C. Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. Vol. 1614, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2003
313. Ono A. HIV-1 Assembly at the Plasma Membrane: Gag Trafficking and Localization. *Future Virol*. 2009
314. Ono A. HIV-1 assembly at the plasma membrane. *Vaccine*. 2010
315. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. MTOR regulation of autophagy. Vol. 584, *FEBS Letters*. 2010

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
 UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

316. Burman C, Ktistakis NT. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. Vol. 584, FEBS Letters. 2010
317. Yu X, Long YC, Shen HM. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy*. 2015
318. Wang X, Gao Y, Tan J, Devadas K, Ragupathy V, Takeda K, et al. HIV-1 and HIV-2 infections induce autophagy in Jurkat and CD4+ T cells. *Cell Signal*. 2012
319. Killian MS. Dual role of autophagy in HIV-1 replication and pathogenesis. *AIDS Res Ther*. 2012
320. Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*. 2008
321. Espert L, Varbanov M, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Robbins I, Sanchez F, et al. Differential role of autophagy in CD4 T cells and macrophages during X4 and R5 HIV-1 infection. *PLoS One*. 2009
322. Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, et al. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J Cell Biol*. 2009
323. Denizot M, Varbanov M, Espert L, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Garcia E, et al. HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy*. 2008
324. Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest*. 2006
325. Varbanov M, Espert L, Biard-Piechaczyk M. Mechanisms of CD4 T-cell depletion triggered by HIV-1 viral proteins. Vol. 8, *AIDS Reviews*. 2006
326. Torresilla C, Larocque E, Landry S, Halin M, Coulombe Y, Masson J-Y, et al. Detection of the HIV-1 minus strand-encoded Antisense Protein and its association with autophagy. *J Virol*. 2013
327. Clerc I, Laverdure S, Torresilla C, Landry S, Borel S, Vargas A, et al. Polarized expression of the membrane ASP protein derived from HIV-1 antisense transcription in T cells. *Retrovirology*. 2011
328. Madjo U, Leymarie O, Freemont S, Kuster A, Nehlich M, Gallois-Montbrun S, et al. LC3C Contributes to Vpu-Mediated Antagonism of BST2/Tetherin Restriction on HIV-1 Release through a Non-canonical Autophagy Pathway. *Cell Rep*. 2016
329. Borel S, Robert-Hebmann V, Alfaisal J, Jain A, Faure M, Espert L, et al. HIV-1 viral infectivity factor interacts with light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS*. 2014

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

330. Campbell GR, Rawat P, Bruckman RS, Spector SA. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Inhibits Autophagy through Transcription Factor EB Sequestration. *PLoS Pathog.* 2015
331. van Grol J, Subauste C, Andrade RM, Fujinaga K, Nelson J, Subauste CS. HIV-1 inhibits autophagy in bystander macrophage/ monocytic cells through Src-Akt and STAT3. *PLoS One.* 2010
332. Sagnier S, Daussy CF, Borel S, Robert-Hebmann V, Faure M, Blanchet FP, et al. Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J Virol.* 2015
333. Nityanandam R, Serra-Moreno R. BCA2/Rabring7 Targets HIV-1 Gag for Lysosomal Degradation in a Tetherin-Independent Manner. *PLoS Pathog.* 2014
334. Saribas AS, Khalili K, Sariyer IK. Dysregulation of autophagy by HIV-1 Nef in human astrocytes. *Cell Cycle.* 2015
335. Shoji-Kawata S. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. Vol. 87. *The Journal of Japanese Biochemical Society.* 2015
336. Dreux M, Chisari F V. Viruses and the autophagy machinery. Vol. 9, *Cell Cycle.* 2010
337. Müller B, Daecke J, Fackler OT, Dittmar T, Zentgraf H, Kräusslich H-G, et al. Construction and Characterization of a Fluorescently Labeled Infectious Human Immunodeficiency Virus Type 1 Derivative. *J Virol.* 2004
338. Cadima-Couto I, Goncalves J. Towards inhibition of Vif-APOBEC3G interaction: Which protein to target? Vol. 2010, *Advances in Virology.* 2010
339. Barré-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy J-F. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol.* 2013
340. Lengauer T, Sing T. Bioinformatics-assisted anti-HIV therapy. *Nat Rev Microbiol.* 2006
341. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007
342. [https://es.wikipedia.org/wiki/Virus\\_de\\_la\\_inmunodeficiencia\\_humana](https://es.wikipedia.org/wiki/Virus_de_la_inmunodeficiencia_humana)
343. Roland Marquet JCP. Representación esquemática de dos modelos de acción de Vif sobre las proteínas de APOBEC3G. <http://www-ibmc.u-strasbg.fr/spip-arn/rubrique230?lang=en>
344. d'Ydewalle C, Bogaert E, Van Den Bosch L. HDAC6 at the Intersection of Neuroprotection and Neurodegeneration. Vol. 13, *Traffic.* 2012
345. Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol.* 2004

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## BIBLIOGRAFÍA

---

346. Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. Nat Rev Microbiol. 2015
347. Martin-Serrano J, Neil SJD. Host factors involved in retroviral budding and release. Nat Rev Microbiol. 2011
348. [https://es.wikipedia.org/wiki/Virus\\_de\\_la\\_inmunodeficiencia\\_humana#/media/File:HI-virión.png](https://es.wikipedia.org/wiki/Virus_de_la_inmunodeficiencia_humana#/media/File:HI-virión.png)
349. Krämer OH, Mahboobi S, Sellmer A. Drugging the HDAC6-HSP90 interplay in malignant cells. Vol. 35, Trends in Pharmacological Sciences. 2014

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

# ANEXO I – Publicaciones resultantes del trabajo de Tesis Doctoral

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

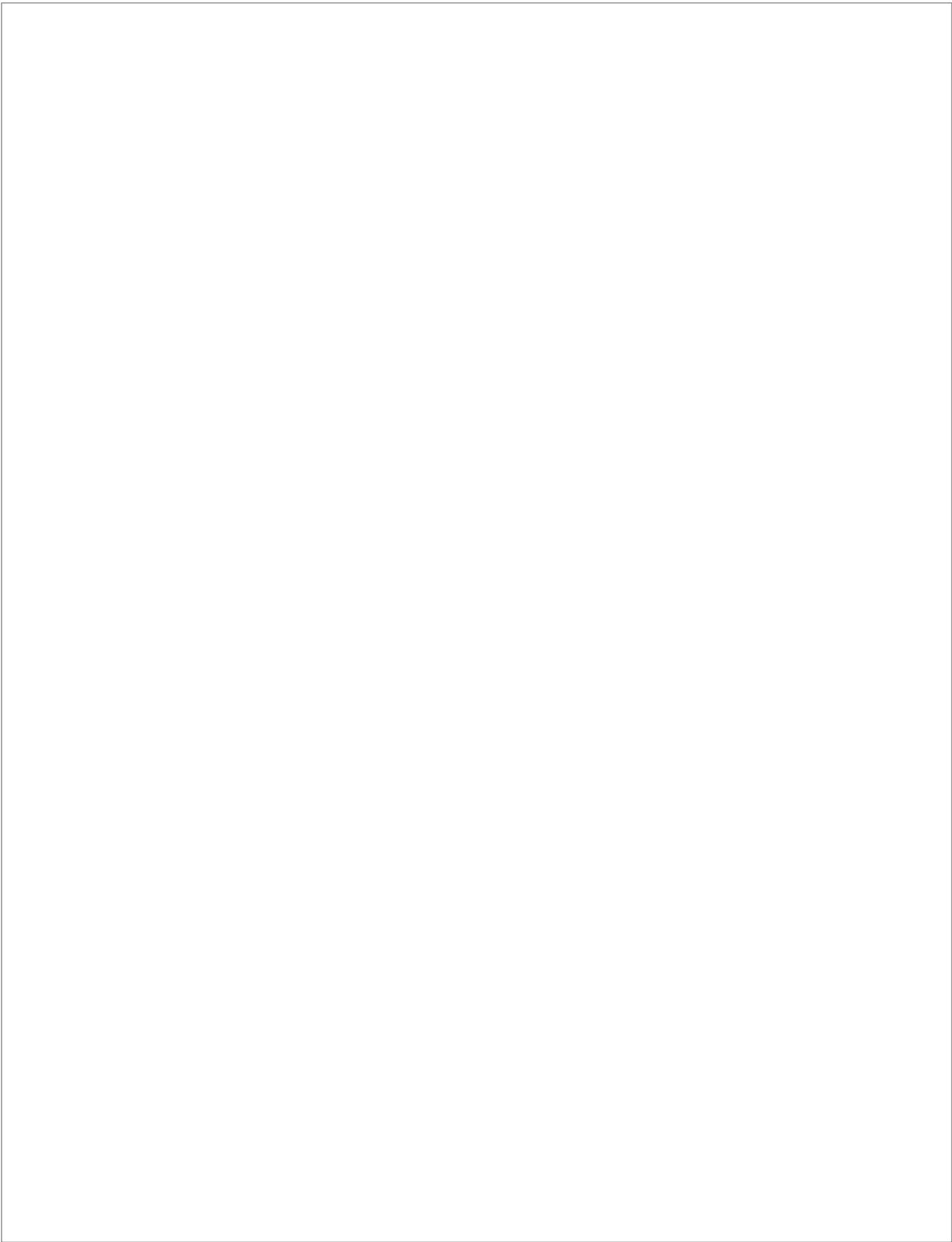
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

La realización de la primera parte de este trabajo de tesis doctoral llevó a la publicación de un artículo científico en la revista *Retrovirology*:

Valera et al. *Retrovirology* (2015) 12:53  
DOI 10.1186/s12977-015-0181-5



RESEARCH

Open Access



## The HDAC6/APOBEC3G complex regulates HIV-1 infectiveness by inducing Vif autophagic degradation

María-Soledad Valera<sup>1†</sup>, Laura de Armas-Rillo<sup>1†</sup>, Jonathan Barroso-González<sup>1</sup>, Serena Ziglio<sup>1</sup>, Julien Batisse<sup>2</sup>, Noé Dubois<sup>2</sup>, Sara Marrero-Hernández<sup>1</sup>, Sophie Borel<sup>3</sup>, Laura García-Expósito<sup>1</sup>, Martine Biard-Piechaczyk<sup>3</sup>, Jean-Christophe Paillart<sup>2</sup> and Agustín Valenzuela-Fernández<sup>1\*</sup>

### Abstract

**Background:** Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has evolved a complex strategy to overcome the immune barriers it encounters throughout an organism thanks to its viral infectivity factor (Vif), a key protein for HIV-1 infectivity and in vivo pathogenesis. Vif interacts with and promotes apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G (A3G) ubiquitination and subsequent degradation by the proteasome, thus eluding A3G restriction activity against HIV-1.

**Results:** We found that cellular histone deacetylase 6 (HDAC6) directly interacts with A3G through its C-terminal BUZ domain (residues 841–1,215) to undergo a cellular co-distribution along microtubules and cytoplasm. The HDAC6/A3G complex occurs in the absence or presence of Vif, competes for Vif-mediated A3G degradation, and accounts for A3G steady-state expression level. In fact, HDAC6 directly interacts with and promotes Vif autophagic clearance, thanks to its C-terminal BUZ domain, a process requiring the deacetylase activity of HDAC6. HDAC6 degrades Vif without affecting the core binding factor  $\beta$  (CBF- $\beta$ ), a Vif-associated partner reported to be key for Vif-mediated A3G degradation. Thus HDAC6 antagonizes the proviral activity of Vif/CBF- $\beta$ -associated complex by targeting Vif and stabilizing A3G. Finally, in cells producing virions, we observed a clear-cut correlation between the ability of HDAC6 to degrade Vif and to restore A3G expression, suggesting that HDAC6 controls the amount of Vif incorporated into nascent virions and the ability of HIV-1 particles of being infectious. This effect seems independent on the presence of A3G inside virions and on viral tropism.

**Conclusions:** Our study identifies for the first time a new cellular complex, HDAC6/A3G, involved in the autophagic degradation of Vif, and suggests that HDAC6 represents a new antiviral factor capable of controlling HIV-1 infectiveness by counteracting Vif and its functions.

**Keywords:** HIV-1, HDAC6, APOBEC3G, Vif, CBF- $\beta$ , Anti-HIV-1 restriction complex, Autophagic clearance

### Background

APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G or A3G) is a member of the

APOBEC superfamily of cytidine deaminases [1], which are thought to restrict human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity. Following its incorporation into nascent virions, A3G exerts its antiviral effects by deaminating cytidine to uracil in newly synthesized (–)-strand viral DNA, leading to G-to-A invalidating hypermutations in the (+)-strand viral DNA [2–5]. The DNA repair pathway involves uracil-DNA glycosylase while apurinic-apyrimidinic endonuclease degrades A3G-hypermutated viral DNA [6–8]. In contrast, non-degraded

\*Correspondence: avalenzu@ull.edu.es

†María-Soledad Valera and Laura de Armas-Rillo contributed equally to this work

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología Celular y Viral, Unidad de Farmacología, Departamento de Medicina Física y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna (ULL), Campus de Ofra s/n, 38071 La Laguna, Tenerife, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Valera et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

hypermutated (+)-strand viral DNA potentially leads not only to mutated viral proteins and/or altered reading frames, but also to unexpected translation termination codons [2, 3, 5, 9–12]. Additionally, A3G also inhibits HIV-1 infection by a cytidine deaminase-independent pathway involving interaction with viral RNA and impairment of the reverse transcription and integration processes [4, 8, 11, 13–17]. Thus, the ability of A3G to interact with different cellular and/or viral RNA and proteins could compromise or promote its anti-HIV-1 functions [18–20]. A3G might, however, diversify the viral genome, thereby promoting infectious HIV-1 variants and even generating HIV-1 drug-resistant phenotypes [21–24]. These data suggest the existence of a complex A3G-mediated restrictive function against HIV-1, potentially dependent on a variety of A3G targets [12, 25, 26].

HIV-1 employs a complex strategy to overcome immune barriers [27, 28], particularly in target cells, through its auxiliary viral genes, such as the viral infectivity factor (Vif), which is essential for HIV-1 infectivity and in vivo pathogenesis [28–30]. In fact, Vif promotes A3G degradation, eluding its restrictive activity against HIV-1 [31, 32]. Vif binds to several cellular proteins, such as Cullin 5 (Cul5), Elongin B (EloB), EloC, and Rbx2 to form a Vif-BC-Cul5 complex, acting as an ubiquitin ligase (E3)-like complex [32–36]. This Vif-BC-Cul5 complex targets A3G, via Vif-A3G interactions, thus mediating A3G ubiquitination and subsequent proteasome degradation [32–35]. Vif also requires and interacts with the core binding factor  $\beta$  (CBF- $\beta$ ), the non-DNA-binding subunit of a heterodimeric transcription factor, to degrade A3G [36–38]. By this mechanism, Vif indirectly protects viral DNA from A3G deaminations and avoids A3G incorporation into nascent viral particles [32, 39–41]. Moreover, Vif also negatively controls A3G antiviral activity by targeting its mRNA and inhibiting its translation [40, 42, 43].

We have previously reported that HIV-1 stabilizes acetylated microtubules (MT) during early infection, a crucial signal for HIV-1 Env-mediated pore fusion formation, viral entry, and infection [44, 45]. Human histone deacetylase 6 (HDAC6) not only inhibits this early HIV-1 Env/CD4-mediated signalling, but also viral infection and replication, in a deacetylase-dependent manner [44–46]. Furthermore, HDAC6 promotes the formation of aggresomes and activates autophagy [47–51]. Hence, HDAC6 is involved in the transport and clearance of those ubiquitinated proteins that do not enter the proteasome pathway, and that bear unconjugated C-terminal diglycine motifs on their ubiquitin-associated chains [47–52]. In cells where proteasomal clearance is blocked, HDAC6 may also recognize unanchored, protein-free polyubiquitin chains. This event activates

HDAC6-triggered actinomyosin- and autophagy-dependent aggresome processing of proteins [53]. Thus, HDAC6 emerges as a key enzyme for clearing ubiquitinated proteins that fail to enter proteasome pathways. In fact, HDAC6 presents a Cys/His-rich motif in its C-terminal region [54–56], which interacts in particular with ubiquitin and could function as a mono-ubiquitin ligase [51, 52, 57–59]. This motif shows significant sequence homology with BRCA1-associated protein BRAP2 and several ubiquitin-specific proteases, and is known as a DAUP (deacetylase-ubiquitin-specific protease) domain [60], HUB (HDAC6-, USP3- and BRAP2-related) finger [61], ZnF-UBP (ubiquitin C-terminal hydrolase-like zinc finger) [57], PAZ (polyubiquitin-associated zinc finger) [58], or BUZ (bound to ubiquitin zinc finger) domain [47]. Of note, Vif seems to be post-translationally mono-ubiquitinated, being stable and not recruited by the proteasome-degradative pathway [62, 63].

Considering the anti-HIV-1 and pro-aggresome/autophagic functions of HDAC6, it is conceivable that HDAC6 regulates HIV-1 infection by the interplay of A3G and Vif proteins, and the Vif-triggered ubiquitination and subsequent proteasome degradation of A3G. In this study, we show that HDAC6 forms a constitutive complex with A3G that competes for Vif-A3G interaction. This new complex accounts for the steady-state expression level of A3G, thereby neutralizing Vif-mediated A3G ubiquitination and proteasome degradation, and stabilizing Vif-non-targeted A3G. HDAC6 is able to establish a ternary complex through binding to A3G and Vif at the same time. In fact, HDAC6 interacts with Vif and regulates its stability without altering CBF- $\beta$ . Finally, HDAC6 controls HIV-1 infectiveness by regulating the incorporation of Vif into nascent virions through the induction of its autophagic degradation. This mechanism is dependent on the BUZ domain of HDAC6 and requires its deacetylase activity.

Altogether, our results pointed out HDAC6 as a new protein involved in the antiviral machinery of an HIV-1 infected cell.

## Results

### HDAC6 induces Vif degradation, and protects A3G from Vif-mediated degradative activity

To ascertain the ability of HDAC6 to protect A3G against Vif-mediated proteasome degradation, we analyzed A3G degradation by recombinant Vif in HEK 293T permissive cells (lacking A3G), under control conditions (Figure 1a, b) or with overexpressed HDAC6 constructs (Figure 1c). We observed that Vif degrades A3G in a dose-dependent manner, regardless of the A3G-associated tag (Figure 1a, b). However, in presence of overexpressed wt-HDAC6 (Figure 1d), we observed a dose-dependent protective



(see Figure on next page)

**Figure 2** HDAC6 reduces Vif and endogenous CBF- $\beta$  expression. **a** Left, western blot of dose-response effects of HA-wt-HDAC6 and HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ (detected with anti-HDAC6 or anti-HA abs) on over-expressed Vif and endogenous CBF- $\beta$  in the absence of A3G. Lanes 1, 7 and 2, 8 are controls without or with overexpressing Vif, respectively. Right, quantitation of western blots regarding HA-HDAC6- and EGFP-HDAC6- $\Delta$ BUZ-mediated Vif degradation. **b** Cell lysates from control scrambled (SCR) or siRNA-HDAC6-treated cells, expressing recombinant or proviral Vif (pNL4.3-HIV-1). The level of expression of Vif, proviral P55<sup>env</sup> when indicated and endogenous CBF- $\beta$  are shown in each condition. Right, histogram indicates the level of expression of each protein analyzed and normalized by the amount of total  $\alpha$ -tubulin, under any experimental condition. In all western blots,  $\alpha$ -tubulin is the control for total protein. Acetylated  $\alpha$ -tubulin is a read-out for functional deacetylase activity of the remaining endogenous HDAC6. Endogenous HDAC6 expression level is shown. All experiments were performed in HEK 293T cells. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of six independent experiments.

effect against Vif-mediated A3G degradation, which correlated with an extent degradation of Vif (Figure 1d, quantitated in right panel). In contrast, the overexpression of HDAC6- $\Delta$ BUZ, lacking the C-terminal region that bears the Cys/His-rich BUZ motif [56], did not promote Vif degradation and strongly protected A3G from Vif degradation (Figure 1d, quantitated in right panel). This may indicate a potential interaction of HDAC6 with A3G, and/or an HDAC6-triggered decoupling of A3G from the proteasome-induced degradative action of Vif.

Interestingly, in the absence of A3G, we also observed that HDAC6 reduced Vif expression in a BUZ domain- and dose-dependent manner (Figure 2a, quantitated in right panel).

In cells, Vif recruits the transcription factor CBF- $\beta$  together with E1C/B, Cul5 and Rbx to form an E3-ubiquitin ligase complex. In fact, CBF- $\beta$  stabilizes Vif folding and its proviral function in the Vif-Cul5 E3 ligase complex [37, 38, 64]. In order to analyze the effect of HDAC6 on the stability of CBF- $\beta$  in the absence of A3G, we over-expressed Vif in HEK 293T cells and showed that wt-HDAC6 degrades Vif in a dose- and BUZ-dependent manner, without affecting endogenous CBF- $\beta$  (Figure 2a, quantitated in right panel). Interestingly, specific knock-down of endogenous HDAC6 by small interfering RNA (siRNA) enhanced the expression level of recombinant (Figure 2b) or proviral (Figure 2c) Vif without altering the expression of endogenous CBF- $\beta$ . In parallel, we observed an increase on acetylated  $\alpha$ -tubulin level (Figure 2b, c, quantitated in right panel). These results suggest that the endogenous HDAC6 acts on Vif modulating its expression level. Indeed, HDAC6 may also protect A3G by targeting the Vif-Cul5 E3 ligase/CBF- $\beta$  complex by degrading Vif, which nucleates this complex.

In the absence of Vif, A3G was not degraded by the overexpression of wt-HDAC6 or HDAC6- $\Delta$ BUZ constructs (Figure 3a). The EGFP-wt-HDAC6 construct used herein is functional, since it deacetylates two of its main substrates, Hsp90 and acetylated  $\alpha$ -tubulin (Figure 3b), and inhibits HIV-1 Env-gp120-mediated  $\alpha$ -tubulin acetylation in CD4 + T cells (Figure 3c), as previously described [44, 45].

Taken together, our results show for the first time that HDAC6, through its C-terminal BUZ domain, induces the degradation of Vif without affecting CBF- $\beta$  and protects A3G from its Vif-induced degradation.

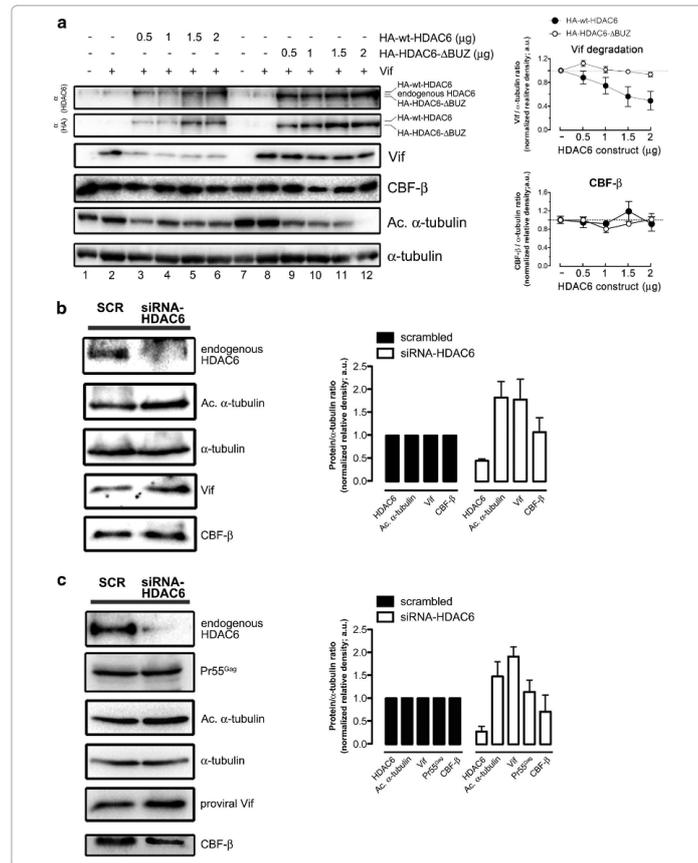
#### HDAC6 interacts with A3G

We next sought to study whether HDAC6 interacts with A3G in the absence of Vif. By co-immunoprecipitation in HEK 293T cells (against A3G or endogenous HDAC6), we observed that A3G interacts with endogenous HDAC6 (Figure 4a, b). Similarly, we found that A3G co-immunoprecipitated with overexpressed EGFP-HDAC6 wild-type or  $\Delta$ BUZ proteins (Figure 4c, d; against A3G or HDAC6, respectively). To ensure these results were not due to the tags used in A3G or HDAC6 constructs, we co-immunoprecipitated overexpressed HA-wt-HDAC6 with either A3G-myc or A3G-Flag proteins, thereby confirming the existence of these A3G/HDAC6 interactions (Figure 4e). As a control for specificity, we co-immunoprecipitated A3G-HA with Vif in HEK 293T cells and confirmed their binding (Figure 4f).

Next, using fluorescence confocal microscopy, we observed that A3G co-distributed with endogenous HDAC6 or over-expressed HDAC6, either upon MT structures (Figure 5a, b; merged images and inset zoom area) where HDAC6 association occurs [44, 45, 65, 66], or in the cytoplasm (Figure 5c). This co-localisation was independent on the tag used (HA or Flag for A3G; EGFP and HA for HDAC6) (Figure 5b, c) and on the BUZ domain of HDAC6 (Figure 5c).

Taken together, this set of experiments indicates that HDAC6 interacts with A3G to form an HDAC6/A3G complex.

In order to ascertain the functional involvement of the C-terminal BUZ domain of HDAC6 in its interaction with A3G, we co-immunoprecipitated A3G against three different HDAC6 constructs: (A) EGFP-wt-HDAC6; (B) EGFP-HDAC6- $\Delta$ BUZ (lacking the BUZ domain); and (C) EGFP-HDAC6-BUZ (containing only the C-terminal Cys/His-rich BUZ motif) (Figure 6a) [56]. These co-immunoprecipitations were performed from HEK 293T cell lysates treated with RNase A to avoid the



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

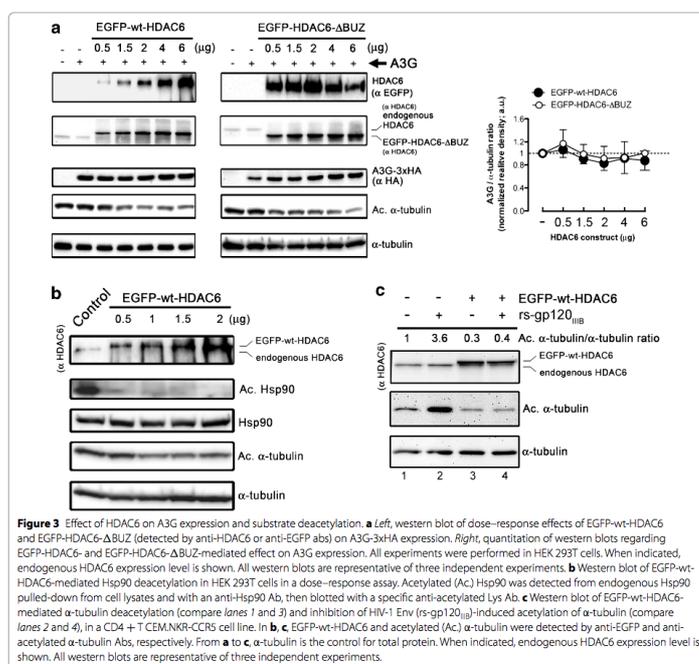
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

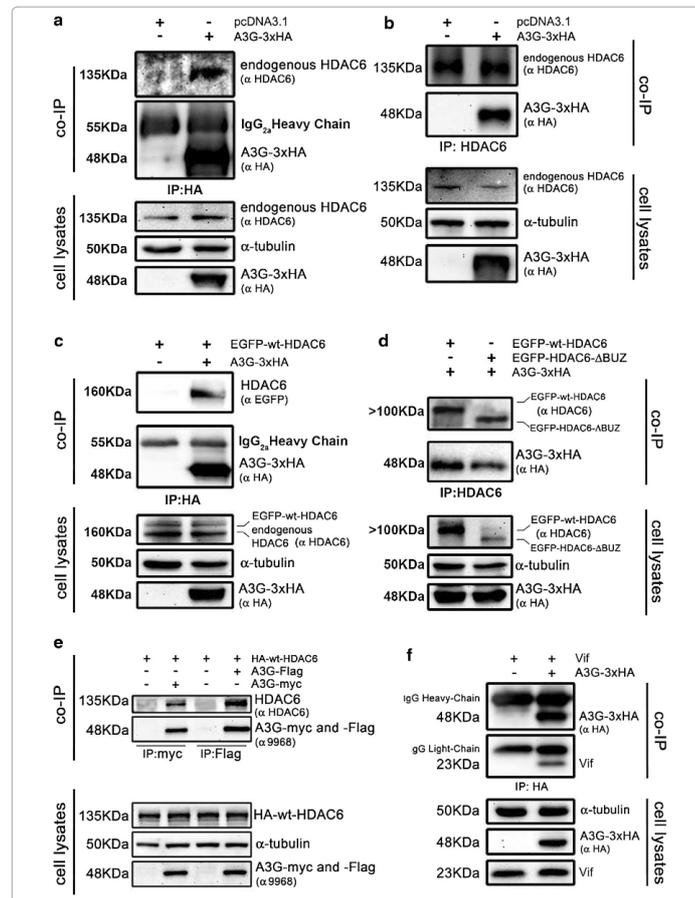
ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



(see Figure on next page)

**Figure 4** Co-immunoprecipitation of HDAC6 and A3G. **a** Cell lysates from control (empty pcDNA3.1 vector) or A3G-3xHA-expressing HEK 293T cells were subjected to co-immunoprecipitation (co-IP) with anti-HA Ab, followed by immunoblotting with HDAC6 and HA Abs. **b** Cell lysates from control (as in **a**) or A3G-3xHA-expressing cells were subjected to co-IP with anti-HDAC6 Ab, followed by immunoblotting with HDAC6 and HA Abs. **c** Cell-lysates from EGFP-wt-HDAC6-expressing or A3G-3xHA/EGFP-wt-HDAC6-co-expressing cells were subjected to co-IP with anti-HA Ab, followed by immunoblotting with EGFP and HA Abs. **d** Cell-lysates from A3G-3xHA/EGFP-wt-HDAC6- or A3G-3xHA/EGFP-HDAC6-ΔBUZ-co-expressing cells were subjected to co-IP with anti-HDAC6 Ab, followed by immunoblotting with EGFP and HA Abs. **e** Cell-lysates from A3G-Flag- or A3G-myc-expressing cells or cells co-expressing HA-wt-HDAC6 with each of the two A3G constructs were subjected to co-IP with anti-myc or anti-Flag Ab, followed by immunoblotting with HDAC6 or A3G Abs. **f** Cell-lysates from control cells (overexpressing recombinant Vif) or A3G-3xHA/Vif-co-expressing cells were subjected to co-IP with anti-HA Ab, followed by immunoblotting with Vif and HA Abs. From **a** to **f**, input expression levels of endogenous HDAC6 or overexpressed constructs are shown in cell lysates-western blots from HEK 293T cells. α-tubulin is the control for total protein. When detected, an IgG<sub>2b</sub> heavy chain of IgG used to pull-down is indicated. Data are representative of three independent experiments.



(see Figure on next page)

**Figure 5** HDAC6 and A3G co-localize along microtubules in cells. **a** A series of confocal images, xy sections, shows expression patterns for endogenous HDAC6 and  $\alpha$ -tubulin, and overexpressed A3G-3xHA. Different merged images are shown to display endogenous HDAC6/overexpressed A3G-3xHA co-distribution and co-distribution of this complex in the cytoplasm or upon MTs ( $\alpha$ -tubulin). In the zoom area (black-bordered inset) is shown the expression of these proteins and their co-distribution, as indicated. **b** Series of confocal images, xy sections, shows expression pattern for overexpressed EGFP-wt-HDAC6 or A3G-3xHA and  $\alpha$ -tubulin. Merged image is shown to display EGFP-wt-HDAC6/A3G-3xHA co-distribution in cytoplasm or upon MTs ( $\alpha$ -tubulin). In the zoom area (black-bordered inset) is shown the expression of these proteins and their co-distribution, as indicated. **c** Series of confocal images, xy sections, shows expression pattern for overexpressed HA-wt-HDAC6, HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ or A3G-Flag and  $\alpha$ -tubulin. Merged image shows HA-wt-HDAC6/A3G-Flag (top) or HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ/A3G-Flag (bottom) co-distribution in cytoplasm or upon MTs ( $\alpha$ -tubulin). From **a** to **c**, data are representative of three independent experiments in HEK 293T cells.

possibility that protein–protein interactions were due to the ability of A3G to interact with nucleic acids or to a potential non-specific HDAC6-associated nucleic acid recruitment. A3G was independently co-immunoprecipitated with EGFP-wt-HDAC6, EGFP-HDAC6- $\Delta$ BUZ and EGFP-HDAC6-BUZ constructs (Figure 6b), suggesting the BUZ domain by itself is required, but not totally indispensable, for the HDAC6/A3G interaction. Thus, this could indicate that redundant A3G interacting motifs exist in the full-length HDAC6 protein.

#### HDAC6 directly interacts with A3G and Vif, and forms an A3G/HDAC6-Vif complex

To further understand the involvement of HDAC6 in a binary (A3G/HDAC6; HDAC6-Vif) or ternary (A3G/HDAC6-Vif) complex, we analyzed protein interactions in vitro by GST pull-down assay (Figure 6c, GST constructs). First, we confirmed the interaction between A3G and Vif by pulling-down HA-Vif with GST-A3G (Figure 6d). As previously observed [67–71], two A3G mutants, A3G-C97A and A3G-D128K, defective in their Vif-induced degradation, presented a slight or a strong defect in their Vif binding capacity, respectively (Figure 6d, left panel). Concerning the A3G/HDAC6 interaction, we observed that A3G interacted with any of the HDAC6 constructs used in our study (Figure 6e), containing or not the BUZ domain, the BUZ domain alone or a dead-mutant (dm) HDAC6 protein which harbours a double point mutation (H216A/H611A) inactivating deacetylation [44, 55, 65]. This dm-HDAC6 mutant was added in our study because the deacetylase activity of HDAC6 has been shown to be involved in promoting autophagosome-lysosome fusion and removal of toxic aggregates [47–49, 72]. The two A3G mutants, C97A and D128K were able to interact with any of the HDAC6 constructs as occurred with wt-A3G (Figure 6d, right panel). Thus, the binding interface between A3G and HDAC6 could be different from the one from A3G and Vif, as observed with the A3G-D128K mutant. Beside, GST-Vif was able to pull-down all HDAC6 constructs (Figure 6e), thus confirming its direct interaction.

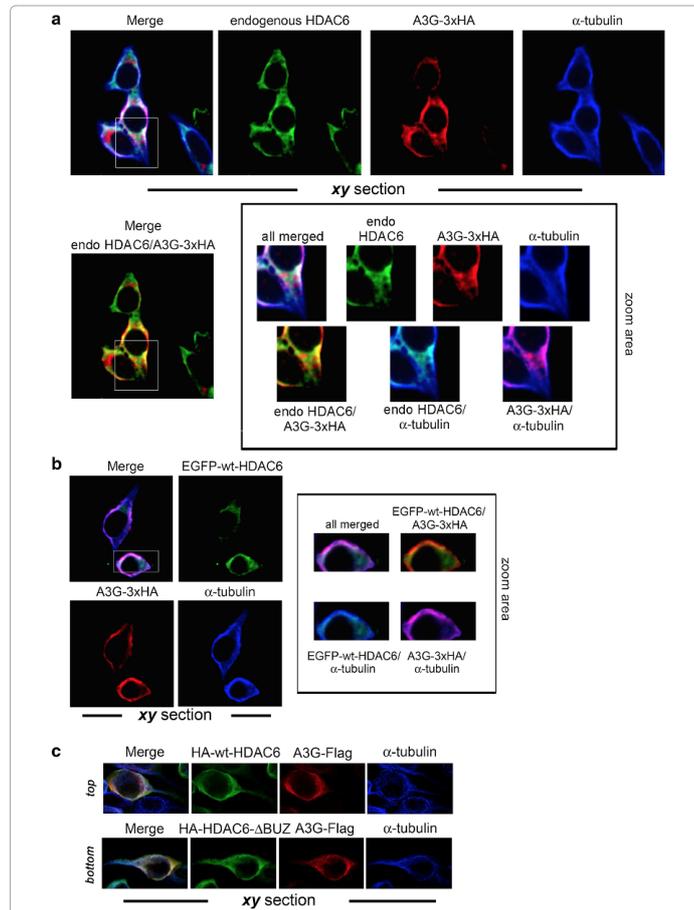
Remarkably, the BUZ domain directly interacts with A3G or Vif (Figure 6e). Data using the HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ construct indicate that regions different from the BUZ domain could also be involved in the HDAC6/A3G or Vif interactions, which could help HDAC6 to compete for the A3G-Vif association thus interfering with the Vif-mediated A3G degradation. Hence, the BUZ domain seems to be responsible for efficient HDAC6/A3G interaction. The H216/H611 residues and subsequent deacetylase activity of HDAC6, it does not seem to be required for the direct HDAC6/A3G interaction. Hence, the HDAC6/A3G or HDAC6/Vif appears to be established through different regions of the molecule.

Altogether, these results confirm that the BUZ domain, together with other regions of HDAC6 (excepted the deacetylase domain), are responsible for its interaction with A3G.

Furthermore, we showed that a ternary complex can be formed between HDAC6, A3G and Vif (Figure 6f; and scheme (2) in Figure 6g). Indeed, we showed that Vif could not interact with A3G-D128K (Figure 6d, left panel; and scheme (3) in Figure 6g), contrary to HDAC6 that still interacted with the two A3G mutants (Figure 6d, right panel; and scheme (1) in Figure 6g). By using the GST-A3G-D128K, we observed that this A3G mutant is able to pull-down together HDAC6 and Vif (Figure 6f), thereby indicating that a ternary A3G/HDAC6-Vif complex has been established. Once more, the BUZ domain does not seem to be absolutely required as a ternary complex can still be formed with the HDAC6- $\Delta$ BUZ construct, even if this protein was less present in the pull-down fractions (Figure 6f, right panel). Taken together, these results account for the ability of HDAC6 to form a ternary complex with A3G and Vif and open-up the possibility that HDAC6 competes for the A3G-Vif interaction, thus protecting A3G from its Vif proteasomal degradation.

#### Vif interacts with HDAC6/A3G

We next analyzed the effect of Vif on the formation of the HDAC6/A3G complex. For this, we



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



(see Figure on previous page)

**Figure 6** HDAC6 directly interacts with A3G and Vif to form a ternary complex. **a** Schematic representation of EGFP-HDAC6 constructs used in this assay. The constructs are (A) EGFP-wt-HDAC6, (B) a construct lacking the BUZ domain (EGFP-HDAC6- $\Delta$ BUZ) and (C) a construct bearing the BUZ domain. **b** RNase A-treated cell lysates from HEK 293T cells co-expressing A3G-3xHA and each of the three EGFP-HDAC6 constructs [see (a)], were subjected to co-IP with anti-EGFP Ab, followed by immunoblotting with specific Abs against EGFP or HA. Input expression levels of each EGFP-HDAC6 construct used and overexpressed A3G-3xHA are shown in cell lysates-Western blots.  $\alpha$ -tubulin was the control for total protein. Data shown are representative of three experiments. **c-f** Direct in vitro interaction of HDAC6 with A3G and Vif. **c**, Coomassie blue staining shows the electrophoretic migration profile of the recombinant GST, GST-A3G, GST-A3G mutants (C97A and D128K) and GST-Vif fusion proteins. **d**, Recombinant GST-proteins were incubated with purified in vitro translated HA-Vif [(d), left panel] or HA-HDAC6 proteins [(e); and (d), right panel] or both HA-Vif and HA-HDAC6 proteins [(f)]. In **f**, a ternary GST-A3G-D128K/HA-HDAC6 construct/HA-Vif is shown. Bound Vif and HDAC6 proteins were fractionated on a 10% SDS-PAGE, followed by immunoblotting with anti-HA antibody (upper panels). Anti-GST immunoblot shows the loading of the assayed GST-fusion proteins (lower panels). From **b** to **f**, a representative experiment of three is shown. **g** A scheme showing GST-mediated A3G-D128K established interactions, as follows: (1) with HDAC6 (wt or  $\Delta$ BUZ constructs) and (2) with HDAC6 (wt or  $\Delta$ BUZ constructs) in the presence of Vif to form a ternary A3G-D128K/HDAC6-Vif complex. In (3) it is represented the inability of Vif to interact with A3G-D128K.

co-immunoprecipitated both endogenous HDAC6 and A3G [73, 74] from CEM.NKR.CCR5 cell lysates, in the absence or in the presence of overexpressed Vif protein (Figure 7a). First, these data confirm that A3G and HDAC6 can endogenously interact and form a constitutive complex independently of Vif (Figure 7a). Although overexpression of Vif degraded endogenous A3G, we were able to co-immunoprecipitate non-degraded A3G and Vif proteins with HDAC6. These results indicate that HDAC6 interacts with A3G or with Vif, and suggest that the three molecules may coexist in an HDAC6-mediated complex, as observed above with in vitro recombinant proteins (Figure 6f).

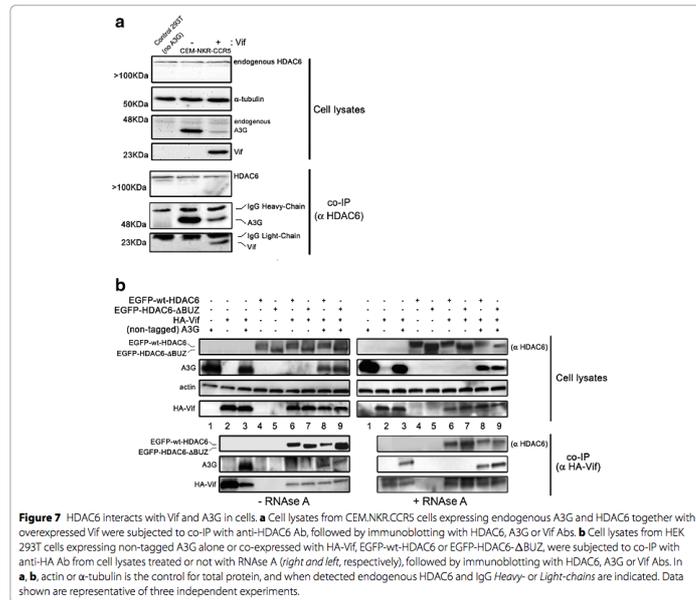
We also seek for a potential HDAC6-Vif binding in HEK 293T cells overexpressing both proteins together with A3G (Figure 7b), and from cell lysates treated or not with RNase A. We observed that HA-Vif co-immunoprecipitates with wt-HDAC6 or HDAC6- $\Delta$ BUZ, whether A3G was present or not, suggesting that HDAC6 and Vif interact in a BUZ-independent manner (Figure 7b, lanes 6 and 7). Moreover, co-immunoprecipitated A3G could correspond to proteins that directly interact with Vif (Vif/A3G) (Figure 7b, lane 3), or indirectly through its interaction with HDAC6 (Vif-A3G/HDAC6 complex) (Figure 7b, lanes 8 and 9). As previously observed (Figure 1d), overexpression of wt-HDAC6 in the presence of Vif induced a slight decrease in A3G expression (Figure 7b, compare lanes 3 and 8 in cell lysates), thus suggesting that HDAC6 forms a complex with A3G that modulates its steady-state expression in the presence of Vif. Moreover, all binary (Vif/A3G and Vif/HDAC6) and ternary (Vif-HDAC6/A3G) interactions observed above were direct as they were also detected from cell lysates treated with RNase A (Figure 7b, right panel), suggesting RNA is not a binding partner. Altogether, these findings suggest that Vif interacts with the HDAC6/A3G complex through its A3G- and/or HDAC6-associated binding sites. The ability of HDAC6 to interact with Vif could

account for the above reported HDAC6-mediated degradation of Vif and A3G protection, in a BUZ domain-dependent manner.

#### HDAC6 impairs Vif-mediated A3G ubiquitination and proteasome degradation

Next, we analyzed the ability of Vif to promote the ubiquitination and degradation of A3G in the presence of wt- or  $\Delta$ BUZ-HDAC6, after co-transfection in HEK 293T cells together with Ubiquitin-6xHis. This Ubiquitin construct allowed us to pull-down ubiquitinated proteins, and thereby obtain ubiquitinated A3G (Figure 8a). Before pulling-down total ubiquitinated proteins from cell lysates (24 h post-transfection), intact cells were treated with MG132 for 5 h to accumulate Vif-promoted ubiquitinated A3G species. We observed that overexpression of wt-HDAC6 protects A3G from Vif-mediated ubiquitination and degradation in a dose-dependent manner (Figure 8a, lanes 3 and 4). Indeed, we observed a low precipitation level for ubiquitinated A3G in cells overexpressing wt-HDAC6 (Figure 8a, co-P, lanes 3 and 4), as previously described in cells overexpressing HDAC6 where ubiquitinated proteins accumulated in small amounts prior to aggresome deaggregation and clearance [50, 53]. Although HDAC6- $\Delta$ BUZ protected A3G against Vif-mediated degradation (Figure 8a, cell lysates lanes 5 and 6, and Figure 1d), it did not impede Vif-mediated ubiquitination of A3G (Figure 8a, co-P, lanes 5 and 6), correlating with the inability of the HDAC6- $\Delta$ BUZ mutant to recognize and clear-off ubiquitinated protein aggregates, in contrast to wt-HDAC6 [50].

To further confirm the protective effect exhibited by HDAC6 on Vif-mediated A3G ubiquitination and degradation, we performed similar experiments in which endogenous HDAC6 was silenced by siRNA (Figure 8b). In the absence of Vif, we observed that specific HDAC6 siRNA affected neither A3G expression nor its basal ubiquitination level (Figure 8b, cell lysates and P, compare lanes 1

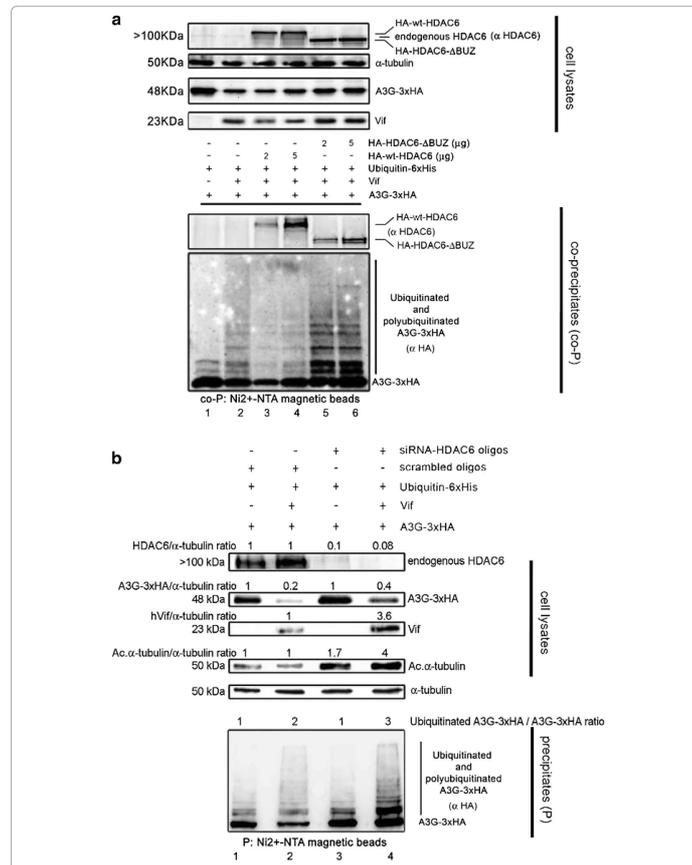


(see Figure on next page)

**Figure 8** HDAC6 protects A3G from Vif-mediated ubiquitination and degradation in a BUZ domain-dependent manner. **a** Cell lysates from controls expressing A3G-3xHA, or lysates co-expressing A3G-3xHA with Vif, HA-wt-HDAC6 or HA-HDAC6-ΔBUZ were subjected to pull-down with Ni<sup>2+</sup>-NTA magnetic agarose beads to precipitate ubiquitinated proteins coupled to Ubiquitin-6xHis (overexpressed in all experimental conditions). Co-precipitated (co-P) extracts were immunoblotted with specific Abs directed against HA and HDAC6 to monitor co-precipitated ubiquitinated (6xHis) A3G together with HDAC6 constructs. **b** Cell lysates from control scrambled or siRNA-HDAC6-treated cells, expressing A3G-3xHA with or without Vif, were subjected to pull-down with Ni<sup>2+</sup>-NTA magnetic beads to precipitate ubiquitinated proteins as above. Precipitated (P) extracts were immunoblotted with a specific Ab directed against HA to monitor ubiquitinated (6xHis) A3G. HDAC6/ $\alpha$ -tubulin (to quantify silencing efficiency), A3G-3xHA/ $\alpha$ -tubulin and (Ubiquitinated A3G-3xHA)/A3G-3xHA (to quantify the increase of A3G ubiquitination) ratios are shown. In **a**, **b**, input expression levels of overexpressed or silenced proteins, as well as endogenous HDAC6 and  $\alpha$ -tubulin are shown. Data shown are representative of three independent experiments.

and 3 without Vif). However, in presence of Vif, specific knockdown of HDAC6 favoured Vif-mediated ubiquitination of A3G (Figure 8b, compare lanes 2 and 4 in P), and did not protect A3G from Vif-mediated degradative activity (Figure 8b, compare lanes 3 and 4 in cell lysates).

As previously observed (Figure 2b), specific knockdown of HDAC6 increased acetylation of  $\alpha$ -tubulin (Figure 8b, cell lysates). Therefore, HDAC6, through its BUZ domain, partially protects A3G by neutralizing the Vif-mediated A3G ubiquitination and proteasome degradation.



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

(see Figure on next page)

**Figure 9** The autophagic degradation of Vif is mediated by the BUZ domain and deacetylase activity of HDAC6. **a, b** Western blot of HDAC6-mediated Vif degradation in HEK 293T cells co-expressing the A3G-C97A (**a**) or A3G-D128K (**b**) mutants resistant to Vif. **c, d** Western blot of HDAC6- or BUZ-mediated Vif degradation concomitant with p62 analysis in HEK 293T cells co-expressing Vif and HA-wt-HDAC6 or HA-BUZ in the absence of A3G, or in cells treated with MG132 or 3-MA inhibitors. **e** Histograms show quantification of the positive effect exerted by proteasomal inhibition by MG132 on wt-HDAC6- and BUZ-mediated Vif autophagic degradation. Data are from three independent western-blot of wt-HDAC6 and BUZ domain constructs, as presented in (**c, d**), comparing Vif/ $\alpha$ -tubulin ratios in Control and MG132 experimental conditions. Data are mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments carried out in triplicate. \*\* and \* are  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$ , respectively, Student's t test. **f** Western blot of HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ- and HA-dm-HDAC6-effect on Vif and p62 stability in HEK 293T cells in the absence of A3G. From **a** to **f**, when indicated, control untreated cells, cells only expressing Vif or each A3G construct or endogenous HDAC6 are shown. When indicated, HDAC6 constructs-deacetylase activity against acetylated  $\alpha$ -tubulin is shown.  $\alpha$ -tubulin is the control for total protein. Data are representative of three independent experiments.

#### HDAC6 mediates Vif degradation independently of A3G-Vif interaction, in an autophagy-dependent pathway

Our data indicate that HDAC6 promotes Vif degradation, and protects A3G from its Vif-triggered proteasome degradation. We next analyzed the ability of HDAC6 to promote Vif degradation in the presence of two A3G mutants, such as A3G-C97A and A3G-D128K, which were reported to be resistant to Vif-mediated proteasome degradation [67–71]. We observed that HDAC6 promoted Vif degradation in the presence of A3G-C97A or A3G-D128K mutants, which in turn were not degraded by Vif in cells that did not overexpress wt-HDAC6 (Figure 9a, b), suggesting that HDAC6 promotes Vif degradation independently of the ability of Vif to interact and/or degrade A3G.

To this end, we studied the degradative pathway triggered by HDAC6, which clears-off Vif in the absence of A3G. We observed that HDAC6-mediated Vif degradation is blocked by 3-methyladenine (3-MA), an inhibitor for autophagic sequestration of cytoplasmic proteins [75–77] (Figure 9c, right panel). On the contrary, overexpression of HDAC6 in untreated or MG132-treated cells triggered Vif degradation, and promoted degradation of p62 or sequestosome 1 (SQSTM1) (Figure 9c). This p62/SQSTM1 protein (hereafter designated p62) connects ubiquitinated protein aggregates to autophagosomes, and also facilitates their clearance [78, 79]. Interestingly, an HDAC6 construct only containing the C-terminal BUZ domain was also able to induce Vif degradation and promote p62 decay (Figure 9d, left panel). This degradation was inhibited by 3-MA but not by MG132 (Figure 9d). Although the MG132 inhibitor did not impede HDAC6-triggered degradation of Vif, it favours the autophagic removal of Vif by either wt-HDAC6 or the C-terminal BUZ domain construct (Figure 9c, d; quantified in Figure 9e). MG132 treatment of cells could favor the HDAC6-mediated autophagic degradation of Vif, as we observed. Remarkably, we did not observe p62 decay and Vif degradation in cells overexpressing HDAC6- $\Delta$ BUZ (Figure 9f, left panel). Although wt-HDAC6 and HDAC6- $\Delta$ BUZ constructs were enzymatically functional

as shown by the onset of  $\alpha$ -tubulin deacetylation (Figure 9c, f), only the HDAC6- $\Delta$ BUZ construct was unable to degrade Vif (Figure 9f).

Next, we asked whether the deacetylase activity of HDAC6 was required to induce the reduction of Vif, as deacetylation was reported to be involved in promoting autophagosome-lysosome fusion and removal of toxic aggregates [49, 50]. Indeed, we observed that the deacetylase mutant [(dm)-HDAC6] did not induce Vif and p62 degradation, in accordance with a decoupling of Vif from the aggresome-autophagy degradation pathway (Figure 9f, right panel). Taken together, our results suggest that Vif is removed in an HDAC6-dependent autophagic pathway requiring its C-terminal BUZ domain and deacetylase activity.

#### HDAC6-mediated proviral Vif degradation inhibits HIV-1 infectiveness

Next, we analyzed the ability of HDAC6 to degrade HIV-1 proviral Vif and its effect on HIV-1 infectiveness. First, in HEK 293T cells overexpressing A3G, we observed that Vif expressed from pNL4.3 HIV-1 provirus degraded A3G in a dose-dependent manner (Figure 10a), using as a control a provirus lacking the *vif* gene. Then, we quantified the effects of HDAC6-mediated proviral Vif degradation on early HIV-1 entry and infection by using a pNL4.3.LucR-E- provirus (bearing the *lacZ* gene) (Figure 10b) [80–83]. The overexpression of pNL4.3.LucR-E- in packaging HEK 293T cells, in conjunction with an X4-tropic envelope (Env) induced a decrease of A3G (Figure 10b, compare lane 2 with control lane 1). This effect was Vif-dependent since overexpression of wt-HDAC6 promoted proviral Vif decrease and subsequent A3G protection in a dose-dependent manner (Figure 10b, lanes 3 and 4). As observed above (Figure 1d), HDAC6- $\Delta$ BUZ protected A3G from proviral Vif-mediated degradation, and was unable to clear off Vif (Figure 10b, lanes 5 and 6).

Free-cell X4-tropic virions produced under these conditions were collected to infect permissive HeLa P5 cells with viral synchronous doses (Figure 10b, histograms).

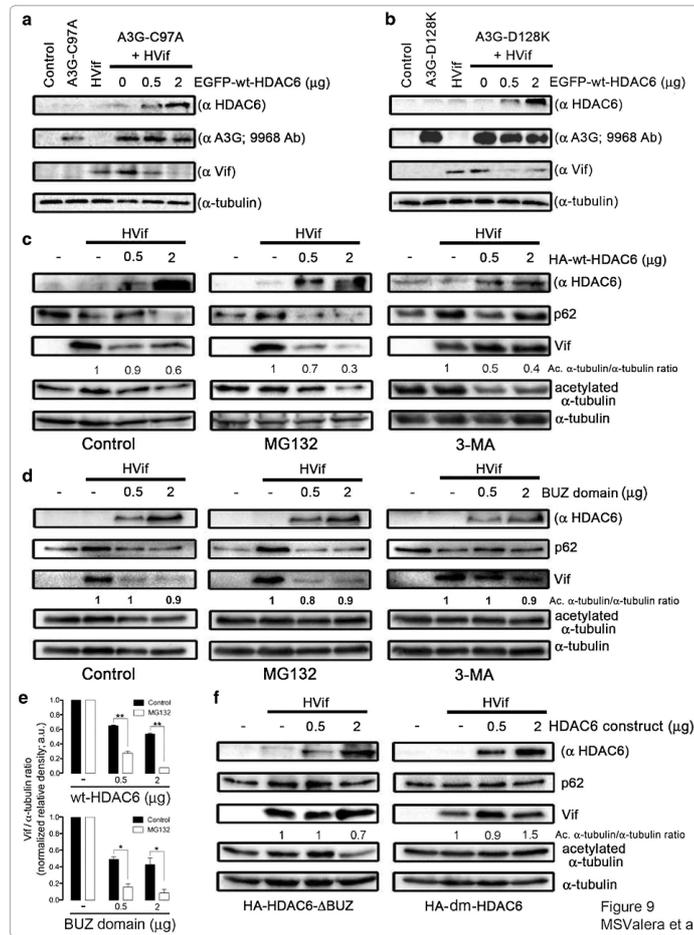


Figure 9  
MSValera et al

(see Figure on next page)

**Figure 10** HDAC6-mediated proviral Vif degradation stabilizes A3G and impairs HIV-1 infectiveness. **a** Western blot of A3G degradation by proviral Vif in HEK 293T cells co-transduced with A3G-3xHA and HIV-1<sub>NL4.3</sub> (dose-response) or HIV-1  $\Delta$ vif provirus. **b** Effect of HDAC6 on HIV-1 infectiveness assayed in HeLa P5 cells incubated with equivalent luciferase-based X4-tropic pNL4-3LucR-E- viral inputs produced in control, or in HEK 293T cells overexpressing A3G-3xHA, or overexpressing HA-wt-HDAC6 or HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ together with A3G-3xHA. The control of infection (+) is represented by virus produced in HEK 293T, only expressing A3G-3xHA. A3G-3xHA and Vif proteins incorporated into nascent virions (p24) are shown. **c** Effect of HDAC6 on HIV-1 infectiveness, assayed in HeLa P5 cells incubated with equivalent R5-tropic pNL4-3LucR-E- viral inputs [same experimental conditions as in (b)], and measured by  $\beta$ -galactosidase activity. **d** Effect of specific HDAC6 siRNA on HIV-1 infectiveness assayed in HeLa P5 cells incubated with equivalent R5-tropic viral inputs produced in siRNA-HDAC6-treated HEK 293T cells, and compared to control (+), scrambled-treated HEK 293T cells. HDAC6/ $\alpha$ -tubulin and proviral-Vif/ $\alpha$ -tubulin expression ratios are shown for this representative experiment. Vif/ $\alpha$ -tubulin ratios from three independent experiments are shown in the right histogram. **e** Western blot of HDAC6-mediated proviral Vif degradation concomitant with p62, in control HEK 293T cells transfected or not with a pNL4-3LucR-E- provirus, together with HA-wt-HDAC6, in the absence of A3G, 3-MA or MG132 treatment is shown under the same conditions. Tubulin-deacetylase activity of HDAC6, and proviral Pr55<sup>Gag</sup> and Vif proteins are shown. All western blots are from a representative experiment of three, and show input expression for endogenous HDAC6 (in control, scrambled- or siRNA-HDAC6-treated cells), overexpressed HA-wt-HDAC6 or HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ, or A3G-3xHA and proviral Pr55<sup>Gag</sup> p24 and Vif proteins. Infection assay were done in triplicate and results are representative of four independent experiments (mean  $\pm$  S.E.M.; n = 12). When indicated,  $\alpha$ -tubulin or actin is the control for total protein.

We observed that HIV-1 early infection was impaired when wt-HDAC6 was overexpressed in packaging HEK 293T cells, thus corresponding to conditions where Vif was degraded and A3G subsequently protected (Figure 10b, histograms, compare control bar in lane 2 with lanes 3 and 4). On the contrary, HIV-1 early infection was enhanced with viruses produced in HEK 293T cells overexpressing HDAC6- $\Delta$ BUZ, where Vif level was increased and A3G apparently protected from Vif degradation (Figure 10b, histograms, bars in lanes 5 and 6), suggesting that HDAC6- $\Delta$ BUZ competes with the anti-HIV-1 activity of the endogenous HDAC6, thus controlling Vif expression level and infectiveness (Figure 10b, compare Vif and infection between lane 2 and lanes 5–6). Indeed, we observed a strong correlation between the amount of Vif in cells producing viruses and in nascent virions under these experimental conditions (Figure 10b, virion lysates). Surprisingly, HIV-1 infectiveness was not correlated to A3G level, apparently stabilized by overexpressed wt-HDAC6 or HDAC6- $\Delta$ BUZ (Figure 10b). Therefore, it seems that HIV-1 infectiveness correlates with Vif stability.

The anti-HIV-1 effect of HDAC6 was similarly confirmed with R5-tropic virions produced in HEK 293T cells with R5-tropic HIV-1 Env, under the same experimental conditions (Figure 10c). Indeed, virions produced with overexpressed wt-HDAC6 were less infectious than control virions or virions produced in the presence of HDAC6- $\Delta$ BUZ (Figure 10c). Accordingly, HIV-1 infectiveness was enhanced in virions produced in HEK 293T cells where endogenous HDAC6 was silenced, in correlation with an increase amount of Vif (Figure 10d). Thus, there is a clear-cut and inverse correlation between the HDAC6 level and its degradative activity against Vif, and HIV-1 infectiveness.

To ascertain the HDAC6-triggered degradative pathway for Vif, we analyzed the expression of Vif in HEK

293T cells treated with proteasome and autophagosome/autophagy inhibitors. We observed that the HDAC6-mediated Vif degradation was blocked by 3-MA but not by MG132 (Figure 10e), without affecting its deacetylase activity (Figure 10e, Ac.  $\alpha$ -tubulin). HDAC6 overexpression appeared to promote autophagy, as evidenced by a low p62 steady-state level and restored by 3-MA treatment (Figure 10e, see also Figure 9c), suggesting that HDAC6 clears-off Vif by inducing its autophagic degradation.

#### Discussion

In this study, we report for the first time that HDAC6 represents a new cellular factor involved in HIV-1 restriction. We showed that HDAC6 directly interacts with A3G and forms a constitutive HDAC6/A3G complex co-distributing in the cytoplasm and along MTs, as expected from the ability of HDAC6 to bind MTs, either directly or through its association with MT-motor machinery [45]. Then, the binding of HDAC6 to A3G or to Vif counteracts Vif activity, which in turn is unable to degrade A3G. Although the C-terminal BUZ domain of HDAC6 appears to be dispensable for HDAC6/A3G interaction, this C-terminal region is required to promote its clearance through autophagy. Moreover, HDAC6 targets Vif, without affecting its CBF- $\beta$  E3 ligase cofactor, in a BUZ-dependent manner. HDAC6 could exert an anti-HIV-1 activity by stabilizing A3G by means of affecting Vif and the subsequent assembly of the Vif-Cul5 E3-ubiquitin-ligase complex that degrades A3G [36, 38]. In fact, interfering with the Vif-CBF- $\beta$  interaction destabilizes the formation and degradative activity of the Vif-Cul5 E3-ubiquitin-ligase complex, as observed for some Elob mutants [38]. Similarly, the apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) has been shown to target Vif and block its interaction with Elob/C, thus affecting the E3 ligase



complex formation and function [84]. HDAC6 appears therefore as a new natural factor that protects A3G by interacting with and degrading Vif.

The HDAC6/A3G interaction also occurred in presence of Vif, and resulted in a ternary A3G/HDAC6-Vif complex that could also be found in a BUZ-independent manner. Similarly, in the absence of A3G, Vif directly interacts with HDAC6 in a BUZ-independent manner. Therefore, it is conceivable that HDAC6/A3G, HDAC6-Vif and the ternary A3G/HDAC6-Vif complexes may be established by different binding sites, as observed by the ability of various HDAC6 mutants and the BUZ domain to interact with A3G or Vif, being the BUZ domain responsible for the HDAC6-mediated degradation of Vif. Remarkably, the BUZ domain directly interacts with A3G or Vif (Figure 6e), thus confirming that HDAC6 could compete for the A3G-Vif interaction and target Vif for HDAC6-mediated aggresome-autophagic degradation, rescuing A3G in a BUZ dependent manner.

The HDAC6/A3G, HDAC6-Vif or HDAC6/A3G-Vif associations are established by direct protein-protein interactions and seems not to be mediated by the interplay of CBF- $\beta$ , of any nucleic acids that could be targeted by Vif and/or A3G just harbouring HDAC6 into the different complexes. Hence, direct interaction and complexes described here were confirmed by a GST-based in vitro protein-protein interaction system, by using protein recombinant-mediated pull-down experiments, and from cell lysates treated with RNase A.

Additionally, we showed that HDAC6 protects A3G from Vif-mediated ubiquitination and degradation in a dose-dependent manner. Hence, we observed low precipitation levels for ubiquitinated A3G in cells overexpressing HDAC6, as previously reported for ubiquitinated aggregates [50, 53]. Although HDAC6- $\Delta$ BUZ interacts and co-distributes with A3G, and appears to protect A3G against Vif-mediated degradation, it does not abrogate Vif-mediated ubiquitination of A3G. This could correlate with the fact that HDAC6- $\Delta$ BUZ is unable to bind free or protein-associated ubiquitin, or to clear ubiquitinated protein aggregates compared to wt-HDAC6 [50]. Similar defects have been described with C-terminal point mutants disrupting the ability of HDAC6 to bind ubiquitin [51, 53, 58]. We observed, in presence of Vif, that knockdown of HDAC6 favoured Vif-mediated ubiquitination and degradation of A3G, suggesting that endogenous HDAC6 exerts anti-Vif activity. Thus, HDAC6 could protect A3G from Vif-mediated degradation by two cooperative actions: (1) by directly triggering Vif degradation in a BUZ-dependent manner, a process that it is also favoured by the HDAC6-deacetylase activity; and (2) by forming an HDAC6/A3G complex thus decoupling A3G from the Vif-associated proteasomal degradation

pathway (see Additional file 1: Summary illustration). This is exemplified by the HDAC6- $\Delta$ BUZ construct that inhibited Vif-mediated proteasomal degradation of A3G but failed to impair A3G ubiquitination by Vif. Thus, HDAC6 appears to stabilize non-ubiquitinated A3G molecules by forming an HDAC6/A3G complex. In this way, it controls the level of A3G expression, and clear ubiquitinated A3G molecules in a dose-dependent manner. The ability of HDAC6 to control A3G steady-state expression through an HDAC6/A3G complex could be important for A3G immune functions, which are known to occur when the editing enzyme is expressed at high levels, and/or in those infectious environments where Vif is depleted from virions [3, 12, 21, 26, 85–87].

The clearance of Vif by HDAC6 occurs whether Vif is expressed from an expression vector or from a proviral construct, and whether A3G is expressed or not. Moreover, HDAC6-mediated proviral Vif degradation is insensitive to MG132, but is blocked by 3-MA, an inhibitor for autophagic sequestration of cytoplasmic proteins that act on class III PI3 kinase complex [75–77]. HDAC6 also promotes degradation of p62, a molecule connecting ubiquitinated protein aggregates to autophagosomes to facilitate their clearance [78, 79]. The p62 protein becomes incorporated into completed autophagosomes and is degraded in autolysosomes, where inhibition of autophagy correlates with increased p62 levels, suggesting that steady-state levels of this protein reflect an autophagic status [77]. In contrast, HDAC6- $\Delta$ BUZ does not trigger p62 clearance and seems to stabilize and increase Vif expression, confirming the importance of HDAC6 in the clearance of ubiquitinated protein-aggregate in a BUZ domain-dependent manner [47, 49–51]. These processes could be perturbed by 3-MA that alter the formation of the protein-sequestering autophagosome compartment [75–77, 88], thus explaining its inhibitory effect on HDAC6-mediated Vif degradation (Figure 9c). In cells where proteasomal clearance is blocked, protein-free polyubiquitin chains are formed that could be recognized by HDAC6. This event activates HDAC6-triggered actinomyosin- and autophagy-dependent aggresome processing of proteins [53], and could account for the MG132-mediated increase in the ability of wt-HDAC6 and the BUZ domain to degrade Vif by autophagy.

It has been reported that the deacetylase activity of HDAC6 is important in promoting autophagosome-lysosome fusion and removal of toxic aggregates [47–49], thus deacetylase mutants of HDAC6 decouple target substrates from the autophagy-mediated degradation pathway. Here, we showed that the inactivation of the deacetylase domain of HDAC6 (mutant H216A/H611A) not only affects the deacetylation of  $\alpha$ -tubulin [44, 55,

65], but also perturb the degradation of Vif by autophagy (Figure 9d), indicating that the deacetylase activity, in conjunction with the BUZ domain of HDAC6, helps the enzyme to form aggresomes and clears-off Vif by autophagy. This effect seems to be independent on the HDAC6/Vif interaction as HDAC6 constructs lacking the BUZ or the deacetylase motifs still interact with Vif (Figures 6b, 7b).

Vif uses both degradation-dependent and -independent mechanisms to counteract A3G antiviral activity. Indeed, Vif has been shown to block the encapsidation of an A3G mutant (A3G-C97A) without any neutralisation/degradation of this mutant by Vif in cell [67]. Here, we showed that HDAC6 was still able to promote the degradation of Vif in presence of A3G-C97A and A3G-D128K mutants, both resistant to Vif-mediated proteasome degradation. Of note and as previously observed [67–71], (1) both mutants are resistant to Vif-mediated proteasome degradation (Figure 9a), and (2) the C97A substitution, which abrogates A3G multimerization, does not affect its interaction with Vif (Figure 6d), while the D128K substitution can no longer interact with Vif (Figure 6d–f). Thus, HDAC6 could protect wt- or A3G mutants and degrade Vif independently on the ability of Vif to degrade and interact with A3G.

In fact, we observed a clear-cut correlation between the HDAC6 ability to degrade HIV-1 Vif and the restoration of A3G level in cells producing virions and HIV-1 infectiveness, regardless viral tropism. Indeed, HIV-1 infection was impaired when viral particles were produced in HEK 293T cells overexpressing wt-HDAC6, where Vif is degraded and A3G subsequently protected. On the contrary, infectivity of viruses produced in HEK 293T cells overexpressing HDAC6-ΔBUZ was enhanced. This effect was not completely surprising as the BUZ domain of HDAC6 is required for the autophagy-mediated degradation of Vif. Moreover, the fact that ubiquitinated A3G are increased when the BUZ domain is absent (Figure 8a) suggests these A3G species are not functional in their restrictive activity against HIV-1 (Figure 9b). Therefore, it appears that HIV-1 infectiveness correlates with the stability of Vif, which is inversely dependent on HDAC6 expression level, rather than on the level of A3G expression. In the present work, we report that the amount of Vif incorporated into nascent virions correlates with their infective activity, being these events directly dependent on the level of HDAC6 expression and on its ability to promote Vif autophagic degradation (Figure 10b). Thus, HIV-1 infective activity is directly related to the level of Vif incorporated into nascent virions, rather than the presence of A3G (Figure 10b), as recently reported [89]. Of note, Vif level increased with HDAC6-ΔBUZ either in cells producing virions or into nascent virions, thereby

generating more infectious virions than those derived from control cells. The same holds true when endogenous HDAC6 was knocked-down (Figure 10d). On the contrary, HDAC6 promotes Vif degradation and impairs its incorporation into nascent virions, thereby diminishing viral infectivity (Figure 10b, c). Altogether these data indicate that HDAC6 is controlling the infectiveness of nascent viral particles by compromising the amount of Vif incorporated into the virions, a process that is independent of the presence of A3G. Consequently, the anti-viral function of HDAC6 could be overcome by an increased expression level of Vif during viral replication.

Considering that (i) HIV-1 stabilizes acetylated microtubules during the initial HIV-1 Env/CD4 contacts to favour pore fusion formation and infection [44, 46, 90], and (ii) HDAC6 plays an anti-HIV-1 replicative activity regulating this process [44–46], in conjunction with the impairment of both Tat proviral function (by HDAC6-mediated Tat deacetylation) [91] and the proposed HDAC6/A3G restriction complex, the regulation of HDAC6 in immune cells could represent a new way to overcome HIV-1 Vif proviral functions and control HIV-1 infectiveness. It is plausible that the amount of endogenous HDAC6 conditions the permissibility of cells against HIV-1 infection, first by exerting its above-reported antiviral actions, and second, by efficiently forming the physiological HDAC6/A3G complex, essential for promoting A3G and HDAC6 anti-viral functions.

#### Conclusions

These findings led us to propose that HDAC6 and HDAC6/A3G may represent a natural antiviral factor and complex, respectively. They would be capable to protect the antiviral activities of A3G and promote the autophagic degradation of Vif, thus impairing its incorporation into nascent virions and HIV-1 infectiveness (see Additional file 1: Summary illustration). We propose HDAC6 as a new natural factor that restricts HIV-1 infection.

#### Methods

##### Antibodies and reagents

Rabbit anti-HDAC6 (H-300; c-11420), anti-ubiquitin (FL-76; sc-9133), anti-EGFP (FL; sc-8334) and anti-HA (sc-805) polyclonal antibodies (polyAbs), goat APOBEC3G (Q17; sc-27521) polyAb, and mouse anti-HIV-1 Vif (319; sc-69731), anti-HA-probe (F-7; sc-7392), anti-c-myc (9E10; sc-40), and anti-Hsp90α/β (F-8; sc-13119), anti-CBF-β (sc-56751) and anti-p62/SQSTM1 (D-3; sc28359) monoclonal Abs (mAbs), or rabbit anti-acetylated lysine (AB3879) polyAb were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), or Millipore (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA), respectively.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

Rabbit anti-(HIV1 p55 + p24 + p17) (ab63917) polyclonal Ab was purchased from Abcam (Cambridge Science Park, Cambridge, UK). Mouse anti- $\alpha$ -tubulin (clone B-5-1-2), anti-acetylated tubulin (clone 6-11B-1), anti- $\beta$ -actin (clone AC-74; A2228) and anti-Flag M2 (clone M2; F1804) mAbs, and anti-Flag (F7425) and anti-HA (H6908) rabbit polyclonal Abs were obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies, specific for any antibody species assayed, were purchased from Dako (Glostrup, Denmark), while Alexa Fluor 568-labeled donkey anti-goat, Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 633-labeled goat anti-mouse, Alexa Fluor 568-labeled goat anti-rabbit, Alexa Fluor 633-labeled rabbit anti-mouse, Alexa Fluor 568-labeled donkey anti-rabbit, Alexa Fluor 488-labeled rabbit anti-goat were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Neutralizing mAb RPA-T4 (eBioscience, San Diego, CA, USA) was directed against CD4 and used to inhibit HIV-1 entry and infection. Endotoxin-free, recombinant soluble (rs) X4-tropic HIV-1 Env-gp120-III<sub>B</sub> protein (rs-gp120<sub>III<sub>B</sub></sub>) was produced in *Escherichia coli* by Innogenetics (Ghent, Belgium) and used as previously described [80, 81, 92]. MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al), ALLN and 3-methyladenine (3-MA) inhibitors were acquired from Sigma-Aldrich. Complete 25X and Phostop 10X inhibitors and the RNase A enzyme were obtained from Roche Diagnostics (GmbH, Mannheim, Germany). TNT<sup>+</sup> Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega BioSciences, LLC; CA, USA) was used for in vitro production of recombinant proteins. Monoclonal Anti-HA-Agarose antibody for recombinant protein purification was purchased from Sigma-Aldrich. Glutathione-Sepharose and pGEX-4T1 were from Amersham Biosciences (NJ, USA). Anti-HA monoclonal antibody (clone 16B12) was purchased by Covance Antibodies (Covance, MA, USA), whereas mouse monoclonal anti-GST antibody (sc-138) was from Santa Cruz Biotechnology. For Western blotting, secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-IgGs were from Pierce Antibodies (Thermo Fisher Scientific Inc., NYSE: TMO).

#### Cells

HEK 293T cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in DMEM (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% foetal calf serum (Lonza), 1% L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin (Lonza). Cells were harvested, passaged every 3 days, and cultured to 50–70% confluence in fresh supplemented DMEM 24 h before cell transfection with viral or human DNA constructs. The HeLa-P5 cells stably transfected with human CD4 and CCR5 cDNAs and

with an HIV-long terminal repeat-driven  $\beta$ -galactosidase reporter gene were provided by Dr. M. Alizon (Hôpital Cochin, Paris, France) and cultured as previously described [44]. The human CEM.NKR-CCR5 permissive cell line (catalog number 4376, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) was grown at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium (Lonza) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Lonza), 1% L-glutamine, and 1% penicillin-streptomycin antibiotics.

#### DNA plasmids and Viral DNA constructs

Drs. X.-J. Yang and N. R. Bertos (Molecular Oncology Group, Department of Medicine, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada) kindly provided all HDAC6 constructs used in the present study [56]. When indicated, these plasmids were cloned into pEGFP-C1 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) or N-terminal tagged with the terminal influenza hemagglutinin (HA) epitope. The pcDNA3.1 (Life Technologies) or pEGFP-C1 (Clontech) vectors were used as a control of cDNA transfection or to express free EGFP, respectively. APOBEC3G (A3G) was kindly provided by Dr. B. R. Cullen (Duke University, USA). A3G open-reading frame (KpnI/EcoRI PCR fragment) was cloned first in frame into a pcDNA 3.1-based vector, modified to encode carboxy-terminal triple HA (3xHA), myc or Flag epitope tags. A3G-C97A and A3G-D128K expression vectors were obtained from wt-A3G after site-directed mutagenesis according to the manufacturer (QuickChange mutagenesis, Agilent Technology). They were subsequently excised using *Hind*III and *Xho*I restriction enzymes and cloned into the pK expression plasmid. A plasmid coding for Ubiquitin-6XHis was kindly provided by Dr. M. S. Rodriguez (Ubiquitin-like proteins & Cancer Group, Proteomics Unit, CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Vizcaya, Spain). The pNL4-3-HIV-1 and pNL4-3.Luc.R-E provirus (catalog number 6070013), the X4-tropic HXB2-*envelope* (*env*, catalogue number 5040154) and R5-tropic pCAGGS-SF162-gp160-*env* (catalogue number 3041817) glycoprotein vectors were obtained via the NIH AIDS Research and Reference Reagent Programme. The HIV-1 pNL4-3 wild-type and  $\Delta$ vif proviruses were kindly provided by Dr. J. Blanco (Fundació IrsiCaixa-HIVACAT, Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain) and by Dr. O. Schwartz (Pasteur Institute, Paris, France), respectively. The pcDNA-hVif plasmid was a gift from Dr. K. Strebel (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, USA). Full-length A3G and HIV-1-vif cDNAs were obtained by PCR using the respective oligonucleotides: A3G

5'-TATATTGAATTCATGAAGCCTCACTTCAGAACAC-3' and 5'-TATATTCTCGAGTCAGTTTCC TGATTCGGGAGAATG-3'; Vif 5'-TATATTGGATCC ATGGAGAACCAGGTGGCAGGTG-3' and 5'-TATATTCTCGAGCTAGTGTCCATTCATGTATGGC-3'. The A3G, A3G-C97A, A3G-D128K or Vif PCR products were cloned into pGEX-4T1 (GE), and then digested by EcoRI/XhoI and BamHI/XhoI, respectively.

#### Messenger RNA silencing

Three double-stranded short interference RNA (siRNA) oligonucleotides (oligos) were generated (Eurogentec, Hampshire, United Kingdom) against the mRNA sequence of HDAC6 and spanning nucleotides 193–213, 217–237, and 284–304, as described previously [44]. One day before nucleofection, HEK 293T cells were grown at 37°C in 10 cm<sup>2</sup> plates to reach 60–80% confluence. Cells were then transfected with a mix of these siRNAs against HDAC6 (in this work referred to as siRNA-HDAC6), at a final total concentration of 1–1.6 μM, or by scrambled control oligos (1–1.6 μM) using an Amaxa nucleofector kit, an Amaxa cuvette-nucleofector device, and a Q-001 program (Amaxa, Lonza). Nucleofected cells from each experimental condition were recovered in 1 mL of DMEM medium and divided in two 10-cm<sup>2</sup> plates per condition in a total volume medium of 10 mL, and kept overnight at 37°C. To analyze HDAC6 silencing, whole cell lysates (40 μg) of transfected cells were analyzed by western blot using a specific anti-HDAC6 polyAb.

#### Immunofluorescence

HEK 293T cells ( $2 \times 10^6$ ) were transfected with A3G-3xHA (1 μg), or EGFP-wt-HDAC6 (1 μg) and A3G-3xHA (1 μg), or HA-wt-HDAC6 (1 μg) or HA-HDAC6-ΔBUZ (1 μg) and A3G-3xHA or A3G-Flag (1 μg) in order to analyze the co-distribution of endogenous HDAC6 with overexpressed A3G or the co-distribution of each overexpressed HDAC6 construct with A3G, respectively. To transfect cells, we used 25 kDa (PEI25k) linear polyethylenimine (Polyscience Inc., Warrington, PA, USA), as previously reported [82, 83]. Briefly, HDAC6 and/or A3G plasmids were first dissolved in 1/10th of the final tissue culture volume of DMEM free of serum and antibiotics. PEI25k was prepared at 1 mg/mL solution in water, and adjusted to neutral pH. After adding PEI25k to the plasmids [plasmids:PEI25k ratio of 1:3 (w/w)], the solution was mixed immediately, incubated for 30 min at room temperature, and added to HEK 293T cells in culture. After 4 h, medium was changed to fresh DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics, and cells were cultivated to 60–70% confluence 24 h after transfection. They were then plated on sterile glass coverslips (Ø, 12 mm; previously coated with poly-D-Lysine

(0.01% in sterile H<sub>2</sub>O)) and kept in culture for 24 h at 37°C. For immunolabelling, cells on sterile glass coverslips were washed three times with PBS and fixed for 5 min in 3% paraformaldehyde in PBS. Cells were again washed three times with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS. After washing with PBS, cells were immunostained; in Figure 4a, with Alexa Fluor 568-labeled donkey anti-goat against A3G (previously incubated with a specific goat polyAb) to detect overexpressed A3G-3xHA; then with Alexa Fluor 488-labelled donkey-anti-rabbit against HDAC6 (previously incubated with a specific rabbit polyAb) to detect endogenous HDAC6. Endogenous α-tubulin was finally detected by an Alexa Fluor 633-labelled goat-anti-mouse against α-tubulin (previously incubated with a specific mAb). In Figure 4b, cells were immunostained with Alexa Fluor 568-labeled goat-anti-rabbit against HA (previously incubated with a specific rabbit polyAb) to detect overexpressed A3G-3xHA; then with Alexa Fluor 633-labelled rabbit-anti-mouse against α-tubulin (previously incubated with a specific mAb). Overexpressed EGFP-wt-HDAC6 was monitored by EGFP-associated green fluorescence. In Figure 4c, cells were immunostained with Alexa 568-labeled donkey-anti-rabbit against Flag (previously incubated with a specific rabbit polyAb) to detect overexpressed A3G-Flag; then with Alexa Fluor 488-labeled rabbit-anti-goat against HA (previously incubated with a specific goat polyAb) to detect HA-wt-HDAC6 or HA-HDAC6-ΔBUZ. Finally, cells were immunostained with Alexa Fluor 633-labelled rabbit-anti-mouse against α-tubulin (previously incubated with a specific mAb). Coverslips were mounted in Mowiol-antifade (Dako) and imaged in xy midsections with a Fluoview FV1000 confocal microscope using a 1.35 NA objective (60x; Olympus, Center Valley, PA, USA) for high-resolution imaging of fixed cells. Final images were analyzed with MetaMorph software (Universal Imaging, Downingtown, PA, USA), as previously reported [83, 92].

#### Western blotting

Protein expression was determined in western blots of cell lysates. Briefly, non-treated HEK 293T cells ( $2 \times 10^6$ ) or those post-24 h nucleofection, were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) 1X and lysed in cold lysis buffer [containing 1% Triton-X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, and protease/phosphatase inhibitors (Roche) at 1X], for 30 min and sonicated twice for 30 s at +4°C. To analyze by western blot the effects of different inhibitors on HDAC6-triggered Vif (recombinant hVif or proviral Vif) or endogenous CFB-β stability, we similarly assayed HEK 293T cells 24 h post-transfection, then treated for 5 h at 37°C with either MG132 [20 μM; DMSO (dimethyl

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

sulfoxide) was the control vehicle] to inhibit the proteasome, or 3-MA (5 mM; PBS for control samples) to inhibit autophagosome formation and subsequent autophagic degradation, monitored by detecting p62/SQSTM1 protein. Cells were then washed twice in PBS 1X, lysed in cold lysis buffer for 30 min, and sonicated twice for 30 s at +4°C. Equivalent amounts of protein (40 µg), measured using the bicinchoninic acid method, were separated by SDS-PAGE on 12% gradient gels and electroblotted onto 0.45 µm polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Millipore) using Trans-blot Turbo (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were probed with specific antibodies and the proteins recognised were detected by luminescence using Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad). They were then analyzed using a ChemiDoc MP device and Image Lab™ Software, version 4.0.1 (Bio-Rad).

#### Immunoprecipitation assays

HEK 293T cells ( $2 \times 10^6$ ) were co-transfected with different plasmids (1 µg) using PEI25k as indicated above, and using non-tagged A3G, A3G-3xHA, A3G-Flag, A3G-myc, HA-Vif (0.25 µg), and/or each HA- or EGFP-tagged HDAC6 construct indicated, and pcDNA3.1 or pEGFP-C1 (0.5 µg) plasmid as a control condition. For ubiquitination experiments, when indicated, MG132 (20 µM) inhibitor and its DMSO-vehicle control were used. 24 h post-transfection, cells ( $1 \times 10^6$ /experimental condition) were washed twice in PBS 1X and lysed in RIPA 1X (PBS 1X, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% SDS) supplemented with protease inhibitors (complete EDTA Free cocktail, Roche). For HDAC6/A3G-Vif interactions, cells were previously treated with the proteasome inhibitor ALLN (25 µM for 16 h), and then, when indicated, treated with RNase A (1 mg/mL). After centrifugation, an input fraction (50 µL) was kept to check the protein expression level, and the rest was incubated for 2 h at 4°C with 2 µg of the different Abs (anti-HA, anti-EGFP, anti-HDAC6, anti-A3G or anti-Flag Abs) used to immunoprecipitate target proteins on a rotating wheel. After equilibration, protein G Dynabeads (Life Technologies) were added and incubated for 1.5 h at 4°C. Beads were washed five times with cold RIPA 1X buffer on a magnet, and eluted in NuPAGE LDS sample buffer 1X (Life Technologies) containing 50 mM glycine pH 2.8. After 10 min at 70°C, immunoprecipitated supernatants were loaded on NuPAGE 4–12% (Life Technologies) or SDS-PAGE 12% gradient gels, and analyzed together with the input cell fractions by western blot, as indicated above. To study the interaction of endogenous HDAC6 with endogenous A3G, CEM.NKR.CCR5 cells ( $5 \times 10^6$ ) were used with the above experimental conditions. Moreover, when indicated, these cells were also nucleofected by pcDNA

hVif vector (0.25 µg cDNA), to ascertain the existence of A3G/HDAC6-Vif ternary interactions.

#### Purification and analysis of Vif-mediated ubiquitinated A3G

HEK 293T cells ( $2 \times 10^6$ ) were transfected using PEI25k, as indicated above, with different plasmid combinations or by siRNA oligos. Thus, cells were transfected by using A3G-3xHA (2 µg), pcDNA-hVif (1 µg), HA-wt-HDAC6 (2 or 5 µg) or HA-HDAC6-ΔBUZ (2 or 5 µg) and Ubiquitin-6xHis (4 µg), which facilitates easy detection of Vif-mediated A3G ubiquitination. For RNA interference of HDAC6, cells were transfected with siRNA-HDAC6 oligos (1 µM) and Ubiquitin-6xHis (4 µg). pcDNA3.1 (2 µg) or scrambled oligos (1 µM) were used as control conditions. As Vif could be poly-ubiquitinated by itself, or by the same E3 ligase [34, 63], thereby entering into the proteasome degradation pathway [63, 93–95], 24 h after transfection, cells were treated with 20 µM of proteasome inhibitor MG132 for 5 h at 37°C and then washed three times in ice-cold PBS 1X, and lysed in 1 mL of Lysis Buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM N-ethyl-maleimide, 0.2% Triton-X-100, 20 mM Imidazole in double-distilled water) for 30 min at 4°C. Lysates were centrifuged at 3,000×g for 15 min at 4°C and free-debris supernatants were collected. Protein analysis from inputs was carried out using these free-debris supernatants. Collected free-debris supernatants were next assayed to immobilize and purify ubiquitinated-6xHis proteins, including ubiquitinated overexpressed A3G-3xHA, by using Ni-NTA magnetic agarose beads (Qiagen, Turnberry Lane, Valencia, CA, USA) (40 µL of beads per 700 µL of total supernatant). Supernatants/Ni-NTA magnetic agarose bead mixes were incubated for 1 h at 4°C in a rotary shaker. Ni-NTA magnetic agarose beads, bearing attached ubiquitinated-6xHis-modified proteins, were precipitated and washed by using a magnet adapter [three times for 2 min each in 500 µL of washing buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 300 mM NaCl, 0.2% Triton-X-100, 20 mM Imidazole in water)]. The remaining buffer was removed without disturbing the magnetic agarose beads. Ubiquitin-6xHis-protein complexes were eluted, and detached from their associated Ni-NTA magnetic agarose beads, in 50 µL of elution buffer (300 mM Imidazole in SDS-PAGE loading buffer 2X) at room temperature for 30 min. Eluted ubiquitinated proteins were analyzed by Western blot (SDS-PAGE 8%), as indicated above. In conjunction with an anti-HA mAb, they then were used to detect ubiquitinated A3G. By using an anti-HDAC6 rabbit polyAb, we detected HDAC6 constructs (HA-wt-HDAC6 and HA-HDAC6-ΔBUZ) co-immobilized and co-precipitated with ubiquitinated A3G-3xHA proteins.

Non-ubiquitinated A3G-3xHA can also be precipitated by this method under any experimental condition. Using cell lysates (input), we analyzed (1) overexpressed HA-HDAC6 constructs with an anti-HDAC6 rabbit polyAb, which also permitted detection of endogenous HDAC6, (2) A3G-3xHA with an anti-HA mAb, (3) hVif with an anti-Vif mAb, and (4)  $\alpha$ -tubulin with a specific mAb.

#### Direct in vitro interaction assays

Full-length HA-tagged wt-HDAC6, HA-HDAC6- $\Delta$ BUZ and BUZ domain mutants, or HA-tagged HIV-1 Vif proteins were expressed in vitro using the rabbit-reticulocyte system, whereas GST, GST-A3G (wt or its mutants) and GST-Vif proteins were expressed in BL21-DE3 *E. coli* cells. HA-tagged proteins were resuspended in RIPA 1X buffer (PBS 1X, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% SDS) supplemented with protease inhibitors (complete EDTA Free cocktail, Roche), and then purified using anti-HA Agarose beads following the manufacturer's recommendations. For extraction of GST proteins, bacteria cells were lysed in Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 30  $\mu$ g/mL Lysozyme, and protease inhibitors) and then purified by affinity using GSH-Sepharose beads. 2  $\mu$ g of purified HA-tagged protein were incubated overnight in RIPA buffer at 4°C with 3  $\mu$ g of GST, GST-A3G (wt, C97A or D128K mutants), or GST-Vif proteins immobilized on glutathione-Sepharose beads. Then, beads were washed three times in RIPA buffer and the bound cellular proteins were analyzed by Western blotting using the appropriate antibodies. Hence, in vitro expressed, purified and pulled-down HA-tagged wt,  $\Delta$ BUZ or BUZ constructs of HDAC6, and HIV-1 Vif proteins were analyzed using an anti-HA monoclonal antibody. Loading of GST proteins was analyzed using an anti-GST antibody.

#### Production of viral particles

Replication-deficient luciferase-HIV-1 viral particles were obtained as previously described [80–83, 92]; specifically, in HEK 293T-packaging cells that were also overexpressing different plasmid combinations of HA-HDAC6 constructs (2  $\mu$ g) and/or A3G-3xHA (1  $\mu$ g), or which had been treated with siRNA-HDAC6 (1–1.6  $\mu$ M) or scrambles oligos (1–1.6  $\mu$ M). Briefly, replication-deficient viral particles were derived by the luciferase-expressing reporter virus HIV/ $\Delta$ nef/ $\Delta$ env/luc + (bearing the luciferase gene inserted into the nef ORF and not expressing envelope glycoprotein) with an X4-tropic (Lai) or R5-tropic (SF162) envelope glycoprotein. X4- or R5-tropic HIV-1 viral particles were produced by co-transfecting HEK 293T cells (70% of confluence) in 10-cm<sup>2</sup> dishes with

pNL4-3.Luc.R-E- (10  $\mu$ g) and X4-tropic (HXB2-env) or R5-tropic (pCAGGS SF162 gp160) Env glycoprotein (10  $\mu$ g) vector and, when indicated, in cells expressing HA-HDAC6 constructs and/or A3G-3xHA, or treated with siRNA-HDAC6 or scrambled oligos. Viral plasmids were transfected in HEK 293T cells (12-well culture plates) using X-tremeGENE HP DNA transfection reagent as recommended by the manufacturer (Roche Diagnostics). After 6 h, medium was changed to RPMI 1640 and supplemented with 10% FCS and antibiotics, with the cells then cultivated for 48 h to allow viral production. Viruses were harvested 48 h post-transfection and HEK 293T cells were lysed to analyze the expression of Pr55<sup>gag</sup>, proviral Vif, endogenous HDAC6 or overexpressed HA-HDAC6 proteins, A3G-3xHA,  $\alpha$ -tubulin or actin. Supernatants containing cell-free viral particles were clarified by centrifugation at 3,000 $\times$ g for 30 min, filtered by 0.45  $\mu$ m, and concentrated by Amicon Ultra-4 Centrifugal filter devices (Millipore). Virions were used to infect HeLa P5 cells or were stored at –80°C. Viral stocks were normalized by p24-Gag content as measured with an enzyme-linked immunosorbent assay test (GenscreenTM HIV-1 Ag Assay) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). To detect protein from nascent virions, supernatants from HEK 293T cells were centrifuged (3,000 $\times$ g for 30 min), filtered (0.2  $\mu$ m) and centrifuge for 4 h at 13,000 $\times$ g. Then, total protein from higher density viral fraction was overnight precipitated by cold acetone (–20°C). Protein pellet was resuspended and treated by Laemmli buffer to detect proteins of interest (A3G, Vif and p24 on virions) by western blot, as above described.

#### Luciferase viral entry and infection assay

HeLa-P5 cells (20,000 cells in 96-well plates with 20  $\mu$ g/mL of Polybrene) were infected with a synchronous dose of luciferase-based X4- or R5-tropic HIV-1 viral inputs (500 ng of p24), in 200  $\mu$ l RPMI 1640 medium for 5 h at 37°C. Virus was then removed by washing and subsequent trypsinization of infected cells. After 48 h of infection, luciferase activity (associated to viruses entry into infected cells) was determined from cell lysates by using a luciferase assay kit (Biotium, Hayward, CA, USA) with a microplate reader (VictorTM X5, PerkinElmer, Waltham, MA, USA), as described [80, 83]. Similarly, HIV-1 infection was measured by measuring  $\beta$ -galactosidase enzymatic activity in 48 h-infected cells (activity associated to cell lysates from infected HeLa-P5 cells) using a  $\beta$ -Gal reporter gene assay (Roche Diagnostics), as previously described [44, 83]. Inhibition of luciferase or  $\beta$ -galactosidase activity was calculated for each dose point after subtracting background (in the presence of a neutralizing anti-CD4 mAb at 5  $\mu$ g/mL), and the

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

background of luciferase measurement/ $\beta$ -galactosidase activity in non-infected cells. Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### Additional file

**Additional file 1:** Summary illustration. Model for HDAC6-mediated A3G protection and control of HIV-1 infectiveness. HDAC6 directly interacts and forms a constitutive complex with A3G. This HDAC6/A3G complex is formed either in the absence (1) or in the presence of the HIV-1 Vif protein (2), and appears to be independent on the BUZ domain of HDAC6 (the different domains of HDAC6 are represented). Moreover, HDAC6 could concomitantly interact with Vif (3). The balance between the level of HDAC6 and Vif expression conditions the efficiency of HDAC6 to interact with A3G (1 and 2) and/or Vif (3 or 4) in the absence or presence of A3G, respectively, to avoid A3G-Vif interaction and subsequent Vif-mediated A3G ubiquitination and proteasome degradation (promoting HIV-1 infection) (pathway 5, the Vif-recruited E3 ligase complex (Vif-CBF- $\beta$ -EloB-EloC-Cul5-Rbx2/E2) that targets A3G is shown). In fact, HDAC6 induces Vif autophagic clearance in a BUZ-dependent manner (pathway 3), thereby inhibiting HIV-1 infectiveness. This event is dependent on the HDAC6-deacetylase activity and could be blocked by the 3-MA inhibitor (6), which perturbs membrane flux during autophagosome formation; a process promoted early on by HDAC6 during autophagy. Hence, HDAC6 competes for the Vif-A3G interaction and subsequent anti-A3G functions (avoiding pathway 5). HDAC6 accounts for A3G steady-state expression level, stabilizing Vif-non-targeted forms of A3G (1). By these mechanisms, HDAC6 impairs HIV-1 infectiveness by Vif clearance (pathway 6) and/or favouring A3G-mediated anti-HIV-1 functions (pathway 1). Therefore, HDAC6/A3G appears as a new natural restriction complex acting against Vif function and HIV-1 infection.

#### Abbreviations

HDAC6: histone deacetylase 6; BUZ: bound to ubiquitin zinc finger; A3G: apolipoprotein B mRNA-editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G); CBF- $\beta$ : core binding factor  $\beta$ ; HIV: human immunodeficiency virus; Vif: viral infectivity factor.

#### Authors' contribution

AV-F designed, supervised and analyzed experiments together with J-CP and MB-P. M-SV, LA-R, JB-G, SZ, JB, ND, SM-H, SB and LG-E performed experiments and analyzed data. M-SV, LA-R, J-CP and AV-F wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Author details

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología Celular y Viral, Unidad de Farmacología, Departamento de Medicina Física y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de La Laguna (ULL), Campus de Oña s/n, 38071 La Laguna, Tenerife, Spain. <sup>2</sup>Architecture et Réactivité de l'ARN, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France. <sup>3</sup>Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS) UMR5236 CNRS UMS51, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

#### Acknowledgements

This work and AV-F are supported by the European Regional Development Fund (ERDF) SAF2008-01729 and SAF2011-24671 (MICINN and MINECO, respectively, Spain), UNLL10-3E-783 (ERDF) and Fundación CajaCanarias, and it has been funded by the Project RD12/0017/0034 integrated in the "Plan Nacional I + D + I" and co-funded by ISCIII "Subdirección General de Evaluación" and ERDF (RIS-RETIC), and by 24-0740-09 (Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE), Spain) and ProD20100020 (Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información, Canary Island Government, Spain) grants. M-SV, LA-R, JB-G, and LG-E are supported by RD12/0017/0034-(RIS-RETIC), SAF2011-24671-FPI, FIPSE-24-0740-09- and SAF2008-01729-associated grants and fellowships, respectively.

J-CP and J.B. were supported by a grant and post-doctoral fellowship from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis (ANRS), respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program for providing HIV-1 plasmids and cells.

#### Compliance with ethical guidelines

**Competing interests**  
The authors declare that they have no competing interests.

Received: 6 May 2014 Accepted: 10 June 2015  
Published online: 24 June 2015

#### References

- Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Giboume J, Dunham I, Scott J et al (2002) An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79:285–296
- Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D (2003) Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424:99–103
- Zhang H, Yang B, Pomerantz RJ, Zhang C, Arumachalam SC, Gao L (2003) The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* 424:94–98
- Shindo K, Takaori-Kondo A, Kobayashi M, Abudu A, Fukunaga K, Uchiyama T (2003) The enzymatic activity of CEM15/Apobec-3G is essential for the regulation of the infectivity of HIV-1 virion but not a sole determinant of its antiviral activity. *J Biol Chem* 278:4442–4446
- Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, Craig HM, Petersen-Mahrt SK, Watt IN et al (2003) DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113:803–809
- Simon JH, Malim MH (1996) The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes. *J Virol* 70:5297–5305
- Gaddis NC, Chenova E, Sheehy AM, Henderson LE, Malim MH (2003) Comprehensive investigation of the molecular defect in vif-deficient human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* 77:5810–5820
- Newman EN, Holmes RK, Craig HM, Klein KC, Lingappa JR, Malim MH et al (2005) Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr Biol* 15:166–170
- Lacostes D, Bouchonnet F, Clewfi F, Hance AJ (2003) Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* 300:1112
- Klarmann GJ, Chen X, North TW, Preston BD (2003) Incorporation of uracil into minus strand DNA affects the specificity of plus strand synthesis initiation during lentiviral reverse transcription. *J Biol Chem* 278:7902–7909
- Mbsa JL, Barr R, Thomas JA, Vandegraaff N, Dorweller JJ, Svarovskaia ES et al (2007) Human immunodeficiency virus type 1 cDNAs produced in the presence of APOBEC3G exhibit defects in plus-strand DNA transfer and integration. *J Virol* 81:7099–7110
- Monajemi M, Woodworth CF, Benkaroun J, Grant M, Larjani M (2012) Emerging complexities of APOBEC3G action on immunity and viral fitness during HIV infection and treatment. *Retrovirology* 9:35
- Li J, Potash MJ, Volsky DJ (2004) Functional domains of APOBEC3G required for antiviral activity. *J Cell Biochem* 92:560–572
- Chiu YL, Soros VB, Kreisberg JF, Stopak K, Yonemoto W, Greene WC (2005) Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 435:109–114
- Li XY, Guo F, Zhang L, Kleiman L, Cen S (2007) APOBEC3G inhibits DNA strand transfer during HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* 282:32065–32074
- Luo K, Wang T, Liu B, Tian C, Xiao Z, Kappes J et al (2007) Cytidine deaminases APOBEC3G and APOBEC3F interact with human immunodeficiency virus type 1 integrase and inhibit proviral DNA formation. *J Virol* 81:7238–7248
- Mbsa JL, Bu W, Pathak VK (2010) APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *J Virol* 84:5250–5259

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

18. Svarovskaya ES, Xu H, Mbisa JL, Barr R, Gorelick RJ, Ono A et al (2004) Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem* 279:35822–35828
19. Wichroski M, Robb GB, Rana TM (2006) Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies. *PLoS Pathog* 2:e41
20. Gallois-Montbrun S, Kramer B, Swanson CM, Byers H, Lynham S, Ward M et al (2007) Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol* 81:2165–2178
21. Berkhout B, de Ronde A (2004) APOBEC3G versus reverse transcriptase in the generation of HIV-1 drug-resistance mutations. *AIDS* 18:1861–1863
22. Mulder LC, Harari A, Simon V (2008) Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5501–5506
23. Kim EY, Bhattacharya T, Kunstman K, Swantek P, Koning FA, Malim MH et al (2010) Human APOBEC3G-mediated editing can promote HIV-1 sequence diversification and accelerate adaptation to selective pressure. *J Virol* 84:10402–10405
24. Sadler HA, Stenglein MD, Harris RS, Minsky LM (2010) APOBEC3G contributes to HIV-1 variation through sublethal mutagenesis. *J Virol* 84:7396–7404
25. Chiu YL, Greene WC (2006) Multifaceted antiviral actions of APOBEC3 cytidine deaminases. *Trends Immunol* 27:291–297
26. Smith HC (2011) APOBEC3G: a double agent in defense. *Trends Biochem Sci* 36:239–244
27. Malim MH, Emerman M (2008) HIV-1 accessory proteins—ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* 3:388–398
28. Harris RS, Hultquist JF, Evans DT (2012) The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J Biol Chem* 287:40875–40883
29. Simon JH, Miller DL, Fouchier RA, Soares MA, Peden KW, Malim MH (1998) The regulation of primate immunodeficiency virus infectivity by Vif is cell species restricted: a role for Vif in determining virus host range and cross-species transmission. *EMBO J* 17:1259–1267
30. Henriet S, Mercenne G, Bernacchi S, Paillart JC, Marquet R (2009) Tumultuous relationship between the human immunodeficiency virus type 1 viral infectivity factor (Vif) and the human APOBEC-3G and APOBEC-3F restriction factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:211–232
31. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646–650
32. Marin M, Rose KM, Kozak SL, Kabat D (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 9:1398–1403
33. Yu X, Yu Y, Liu B, Luo K, Kong W, Mao P et al (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-CUL5-SCF complex. *Science* 302:1056–1060
34. Mehle A, Goncalves J, Santa-Marta M, McPike M, Gabuzda D (2004) Phosphorylation of a novel SOCS-box regulates assembly of the HIV-1 Vif-CUL5 complex that promotes APOBEC3G degradation. *Genes Dev* 18:2861–2866
35. Yu Y, Xiao Z, Ehrlich ES, Yu X, Yu XF (2004) Selective assembly of HIV-1 Vif-CUL5-ElonginB-ElonginC E3 ubiquitin ligase complex through a novel SOCS box and upstream cysteines. *Genes Dev* 18:2867–2872
36. Guo Y, Dong L, Qiu X, Wang Y, Zhang B, Liu H et al (2014) Structural basis for hijacking CBF-beta and CUL5 E3 ligase complex by HIV-1 Vif. *Nature* 505:229–233
37. Jager S, Kim DY, Hultquist JF, Shindo K, LaRue RS, Kwon E et al (2011) Vif hijacks CBF-beta to degrade APOBEC3G and promote HIV-1 infection. *Nature* 481:371–375
38. Wang X, Zhang H, Lv M, Zuo T, Wu H, Wang J et al (2013) Interactions between HIV-1 Vif and human ElonginB-ElonginC are important for CBF-beta binding to Vif. *Retrovirology* 10:94
39. Mariani R, Chen D, Schrofflebauer B, Navarro F, Konig R, Bollman B et al (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114:21–31
40. Stopak K, de Noronha C, Ionomoto W, Greene WC (2003) HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol Cell* 12:591–601
41. Sheehy AM, Gaddis NC, Malim MH (2003) The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9:1404–1407
42. Mercenne G, Bernacchi S, Richer D, Bec G, Henriet S, Paillart JC et al (2010) HIV-1 Vif binds to APOBEC3G mRNA and inhibits its translation. *Nucleic Acids Res* 38:633–646
43. Kao S, Khan MA, Miyagi E, Pishka R, Buckler-White A, Strelak K (2003) The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity. *J Virol* 77:11398–11407
44. Valenzuela-Fernandez A, Alvarez S, Gordon-Alonso M, Barrero M, Ursa A, Cabrero JR et al (2005) Histone deacetylase 6 regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. *Mol Biol Cell* 16:5443–5454
45. Valenzuela-Fernandez A, Cabrero JR, Serrador JM, Sanchez-Madrid F (2008) HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends Cell Biol* 18:291–297
46. Malinowsky K, Lukasz J, Dittmar MT (2008) Susceptibility to virus-cell fusion at the plasma membrane is reduced through expression of HIV gp41 cytoplasmic domains. *Virology* 376:69–78
47. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McClaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggressive formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115:727–738
48. Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR (2005) HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem* 280:40282–40292
49. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB et al (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447:859–863
50. Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS et al (2010) HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J* 29:969–980
51. Ouyang H, Ali YO, Ravichandran M, Dong A, Qiu W, MacKenzie F et al (2012) Protein aggregates are recruited to aggressive by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C-termini. *J Biol Chem* 287:2317–2327
52. Pai MT, Tzeng SR, Kovacs JJ, Keaton MA, Li SS, Yao TP et al (2007) Solution structure of the Ubq-M-SUZ domain, a highly specific protein module that recognizes the C-terminal tail of free ubiquitin. *J Mol Biol* 370:290–302
53. Hao R, Nanduri P, Rao Y, Panichelli RS, Ito A, Yoshida M et al (2013) Proteasomes activate aggressive disassembly and clearance by producing unanchored ubiquitin chains. *Mol Cell* 51:819–828
54. Verdel A, Khochbin S (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem* 274:2440–2445
55. Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4868–4873
56. Bertos NR, Gilquin B, Chan GK, Yen TL, Khochbin S, Yang XJ (2004) Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem* 279:48246–48254
57. Seigneurin-Berry D, Verdel A, Curtet S, Lemerrier C, Garin J, Rousseaux S et al (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* 21:8035–8044
58. Hook SS, Orian A, Cowley SM, Eisenman RN (2002) Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13425–13430
59. Kovacs JJ, Hubbert C, Yao TP (2004) The HDAC complex and cytoskeleton. *Novartis Found Symp* 259:170–177 **discussion 178–181, 223–175**
60. Amerik AY, Li SJ, Hochstrasser M (2000) Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* 381:981–992
61. Bertos NR, Wang AH, Yang XJ (2001) Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol* 79:243–252
62. Dussart S, Courcouil M, Bessou G, Douaisi M, Duverger Y, Vigne R et al (2004) The Vif protein of human immunodeficiency virus type 1 is post-translationally modified by ubiquitin. *Biochem Biophys Res Commun* 315:66–72
63. Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, Gabuzda D (2004) Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 279:7792–7798
64. Hultquist JF, Binka M, LaRue RS, Simon V, Harris RS (2011) Vif proteins of human and simian immunodeficiency viruses require cellular CBFbeta to degrade APOBEC3 restriction factors. *J Virol* 86:2874–2877

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

65. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A et al (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417:455–458
66. Matsuyama A, Shimizu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berry D et al (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* 21:6920–6931
67. Opi S, Kao S, Golla-Gaur R, Khan MA, Miyagi E, Takeuchi H et al (2007) Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits packaging and antiviral activity of a degradation-resistant APOBEC3G variant. *J Virol* 81:8236–8246
68. Bogerd HP, Doehle BP, Wiegand HL, Cullen BR (2004) A single amino acid difference in the host APOBEC3G protein controls the primate species specificity of HIV type 1 virion infectivity factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3770–3774
69. Mangeat B, Turelli P, Liao S, Trono D (2004) A single amino acid determinant governs the species-specific sensitivity of APOBEC3G to Vif action. *J Biol Chem* 279:14481–14483
70. Xu H, Svatovskaja ES, Barr R, Zhang Y, Khan MA, Strebel K et al (2004) A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:5652–5657
71. Batisse J, Guerrero SX, Bernacchi S, Richert L, Godet J, Goldschmidt V et al (2013) APOBEC3G impairs the multimerization of the HIV-1 Vif protein in living cells. *J Virol* 87:6492–6506
72. Dompiere JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S et al (2007) Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27:3571–3583
73. Zhou T, Han Y, Dang Y, Wang X, Zheng YH (2009) A novel HIV-1 restriction factor that is biologically distinct from APOBEC3 cytidine deaminases in a human T cell line CEM.NKR. *Retrovirology* 6:31
74. Zhou T, Dang Y, Baker JJ, Zhou J, Zheng YH (2012) Evidence for Vpr-dependent HIV-1 replication in human CD4+ CEM.NKR T-cells. *Retrovirology* 9:93
75. Seglen PO, Gordon PB (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:1889–1892
76. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H et al (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402:672–676
77. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS et al (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4:151–175
78. Bjorkoy G, Lamark T, Johansen T (2006) p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* 2:138–139
79. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H et al (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282:24131–24145
80. Barrero-Villar M, Barroso-Gonzalez J, Cabrero JR, Gordon-Alonso M, Alvarez-Losada S, Munoz-Fernandez MA et al (2008) P4P5-Kinase Ialpha is required for efficient HIV-1 entry and infection of T cells. *J Immunol* 181:6882–6888
81. Barrero-Villar M, Cabrero JR, Gordon-Alonso M, Barroso-Gonzalez J, Alvarez-Losada S, Munoz-Fernandez MA et al (2009) Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes. *J Cell Sci* 122:103–113
82. Barroso-Gonzalez J, El Jaber-Vazdekis N, Garcia-Exposito L, Machado JD, Zarate R, Ravelo AG et al (2009) The lupane-type triterpene 30-oxo-calenduladiol is a CCR5 antagonist with anti-HIV-1 and anti-chemotactic activities. *J Biol Chem* 284:16609–16620
83. Garcia-Exposito L, Barroso-Gonzalez J, Puigdomenech I, Machado JD, Blanco J, Valenzuela-Fernandez A (2011) HIV-1 requires Arf6-mediated membrane dynamics to efficiently enter and infect T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 22:1148–1166
84. Miyakawa K, Matsunaga S, Kanou K, Matsuzawa A, Morishita R, Kudoh A et al (2015) ASK1 restores the antiviral activity of APOBEC3G by disrupting HIV-1 Vif-mediated counteraction. *Nat Commun* 6:6945
85. Pillal SK, Wong JK, Barbour JD (2008) Turning up the volume on mutational pressure: is more of a good thing always better? (A case study of HIV-1 Vif and APOBEC3). *Retrovirology* 5:26
86. Chiu YL, Greene WC (2008) The APOBEC3 cytidine deaminases: an innate defensive network opposing exogenous retroviruses and endogenous retroelements. *Annu Rev Immunol* 26:317–353
87. Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LL, Grimm SA, Fargo D, Stojanov P et al (2013) An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet* 45:970–976
88. Kovacs AL, Rez G, Palfi Z, Kovacs J (2000) Autophagy in the epithelial cells of murine seminal vesicle in vitro. Formation of large sheets of nascent isolation membranes, sequestration of the nucleus and inhibition by wortmannin and 3-ethyladenine. *Cell Tissue Res* 302:253–261
89. Wang Y, Kinlock BL, Shao Q, Turner TM, Liu B (2014) HIV-1 Vif inhibits G to A hypermutations catalyzed by virus-encapsidated APOBEC3G to maintain HIV-1 infectivity. *Retrovirology* 11:89
90. Sabo Y, Walsh D, Barry DS, Tinazette S, de Los Santos K, Goff SP (2013) HIV-1 induces the formation of stable microtubules to enhance early infection. *Cell Host Microbe* 14:535–546
91. Huo L, Li D, Sun X, Shi X, Karna P, Yang W et al (2011) Regulation of tat acetylation and transactivation activity by the microtubule-associated deacetylase HDAC6. *J Biol Chem* 286:9280–9286
92. Garcia-Exposito L, Zizgic S, Barroso-Gonzalez J, de Armas-Rillo L, Valera MS, Zizgic D et al (2013) Gelsolin activity controls efficient early HIV-1 infection. *Retrovirology* 10:39
93. Akari H, Fujita M, Kao S, Khan MA, Shehu-Xhilaga M, Adachi A et al (2004) High level expression of human immunodeficiency virus type-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the p2/nucleocapsid processing site. *J Biol Chem* 279:12355–12362
94. Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Ito K et al (2009) MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 6:1
95. Mehle A, Wilson H, Zhang C, Brazier AJ, McPike M, Pery E et al (2007) Identification of an APOBEC3G binding site in human immunodeficiency virus type 1 Vif and inhibitors of Vif-APOBEC3G binding. *J Virol* 81:13235–13241

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

La segunda parte de este trabajo de tesis doctoral, donde abordamos el efecto negativo que ejerce HDAC6 sobre la proteína estructural y viral Pr55-Gag, actuando como un posible factor de restricción, se encuentra actualmente en proceso de desarrollo y escritura para, próximamente proceder a su publicación como artículo científico.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

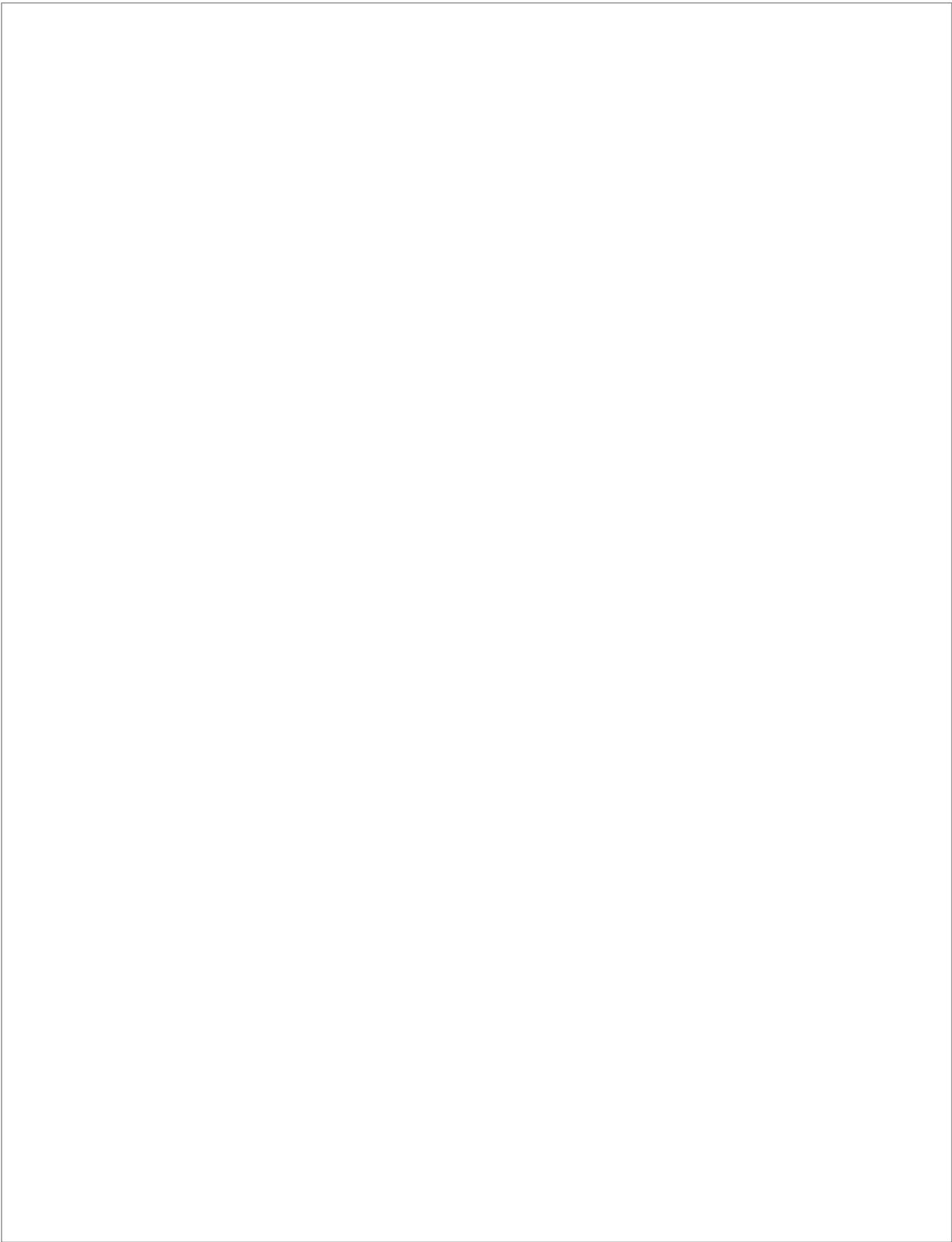
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

## ANEXO II – Otros trabajos publicados durante el periodo formativo

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

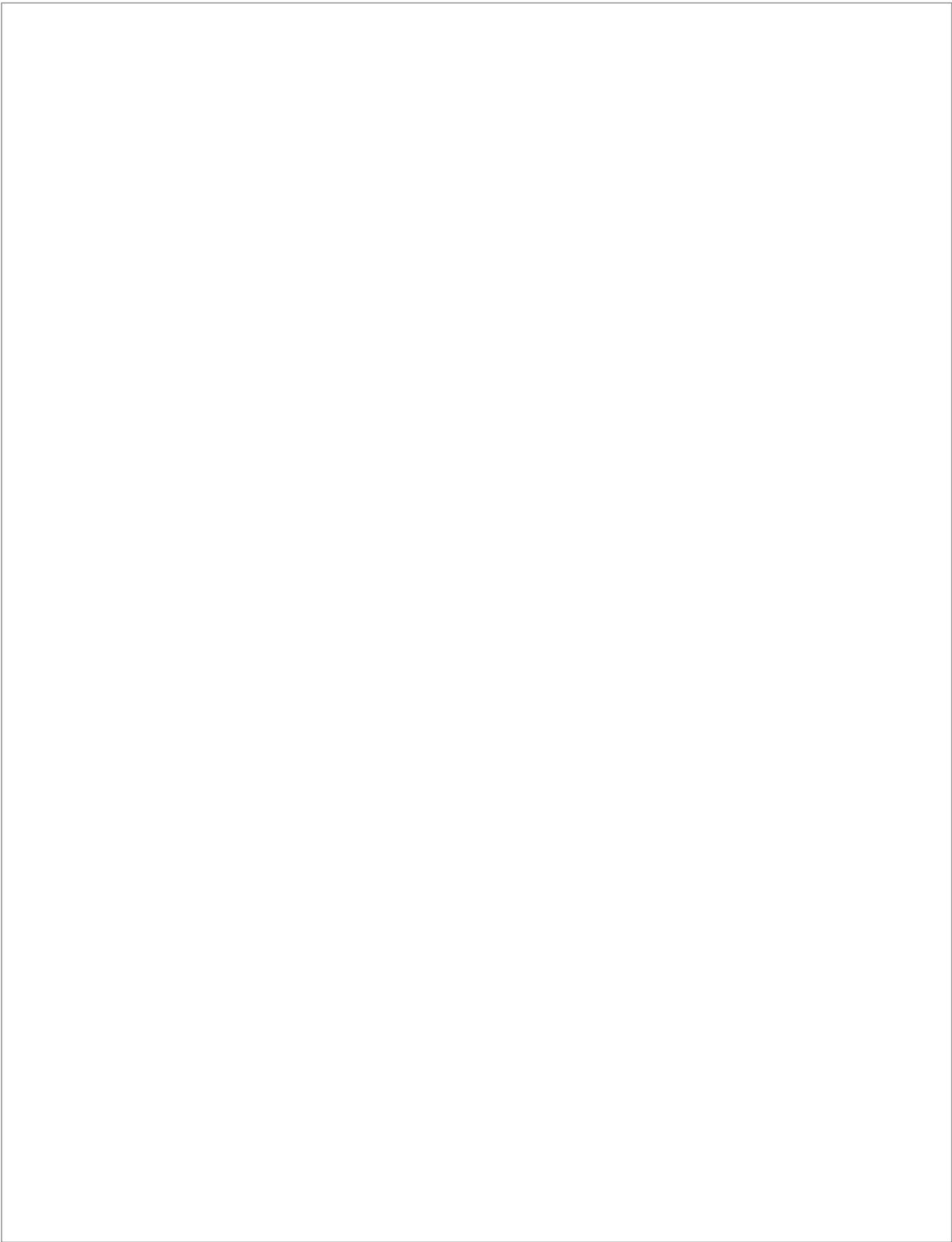
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

Durante el transcurso del desarrollo de este trabajo se publicaron una serie de trabajos, que aunque no guardan relación directa con el objetivo principal de esta tesis se realizaron durante este periodo formativo:

*Viral infection: Moving through complex and dynamic cell-membrane structures*. Barroso-González J, García-Expósito L, Puigdomènech I, **de Armas-Rillo L**, Machado JD, Blanco J, Valenzuela-Fernández A. *Commun Integr Biol*. 2011 Jul;4(4):398-408. doi: 10.4161/cib.4.4.16716.

*Gelsolin activity controls efficient early HIV-1 infection*. García-Expósito L, Ziglio S, Barroso-González J, **de Armas-Rillo L**, Valera MS, Zipeto D, Machado JD, Valenzuela-Fernández A. *Retrovirology*. 2013 Apr 10;10:39. doi: 10.1186/1742-4690-10-39.

*Membrane dynamics associated with viral infection*. **de Armas-Rillo L**, Valera MS, Marrero-Hernández S, Valenzuela-Fernández A. *Rev Med Virol*. 2016 May;26(3):146-60. doi: 10.1002/rmv.1872.

Artículo en revisión:

*In a cluster of HIV-1 Elite Controllers, long-term non-progression is linked to early envelope glycoprotein functions*. Casado C, Valera MS, Pernas M, Marfil S, **de Armas-Rillo L**, Borràs-Grañana F, Olivares I, Marrero-Hernandez S, Marquez-Arce D, Blanco J, Valenzuela-Fernandez A. 2017 *Journal of Virology*.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

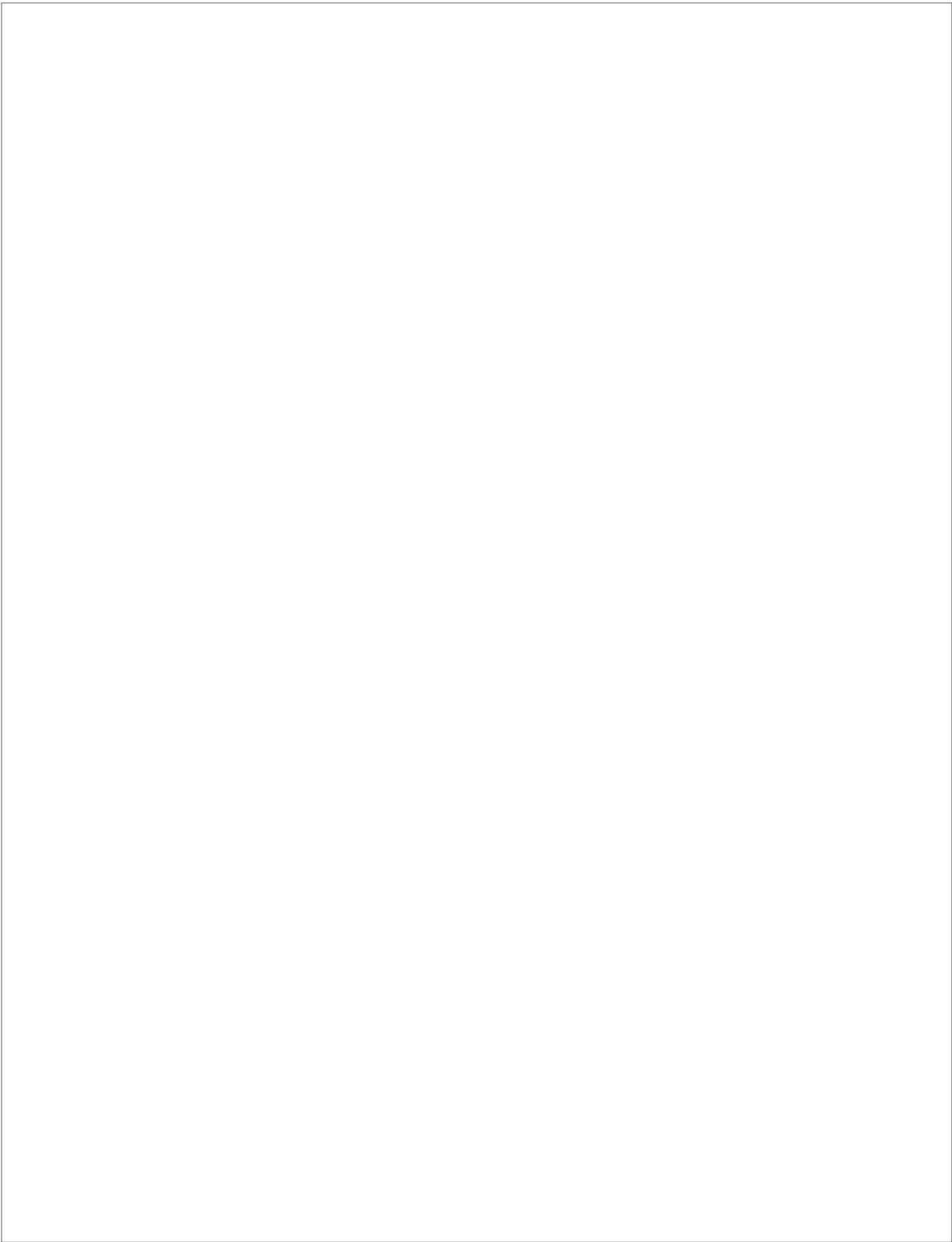
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

*ANEXO III – Memoria de los trabajos  
realizados durante la estancia pre-  
doctoral en la Universidad de  
Estrasburgo. Francia*

---

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

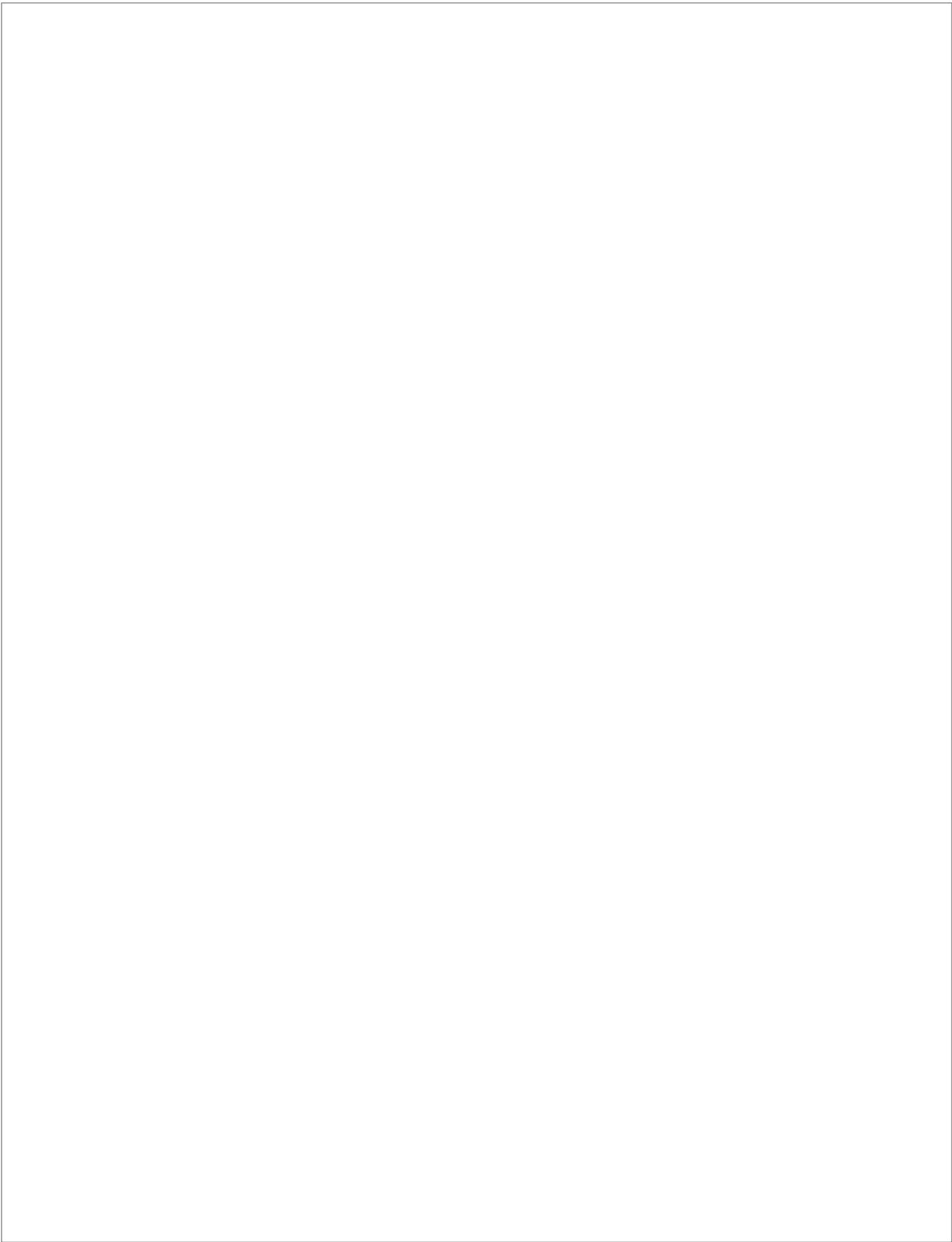
Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

Durante el periodo de tiempo durante el cual se desarrolló este trabajo tuvimos la oportunidad de realizar una estancia de 95 días de duración en el laboratorio del Dr. Jean-Christophe Paillart en la Universidad de Estrasburgo, en Francia. El equipo de investigación del Dr. Paillart junto con el Dr. Roland Marquet, posee una larga y reconocida trayectoria en el estudio de las interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos, así como en el estudio de la estructuración de la partícula viral debido a estas interacciones, tanto del virus VIH como del virus Influenza. Con respecto al VIH, sus estudios se centran en las interacciones entre Pr55-Gag y el genoma viral para la formación de la partícula y en las interacciones entre Vif y A3G. Este equipo describió la región UTR 5' del ARNm de A3G como la región que Vif reconoce, uniéndose a ella e impidiendo la traducción de la proteína. A parte de la oportunidad que supuso la estancia en su laboratorio, por la aportación en el conocimiento de nuevas técnicas y nuevos enfoques en la investigación, nosotros queríamos estudiar si era posible que HDAC6 interaccionase con ácidos nucleicos (ADN o ARN) ya fuesen víricos o celulares y si esta capacidad de interacción guardaba relación con la capacidad de protección de A3G y degradación de Vif que habíamos observado. Lamentablemente, por problemas técnicos surgidos antes de la realización de la estancia y durante la misma no pudimos realizar estos estudios tal y como nos lo habíamos planteado. Aún así, gracias a la buena predisposición del Dr. Paillart tuvimos la oportunidad de ahondar un poco más en ciertos aspectos de la actividad antiviral de HDAC6.

#### **HDAC6 no afecta al bloqueo de la traducción de A3G promovida por Vif**

El equipo del Dr. Paillart, actualmente se encuentra centrado en dos líneas principales de investigación, una de ellas centrada en continuar con la caracterización del reconocimiento e interacción que se produce entre la proteína

viral Vif y el ARNm de A3G, estudiando en profundidad si la interacción se produce por reconocimiento de secuencias o es un reconocimiento estructural, debido a la conformación de *loops* (giros) que sufre el ARNm de A3G.

Aprovechando estos estudios, que se encontraban en proceso en el momento de la estancia, decidimos analizar si la presencia de HDAC6, podía afectar a la inhibición que Vif provoca sobre la traducción de A3G. Para ello siguiendo las condiciones de trabajo del equipo del Dr. Paillart realizamos experimentos de transfección con plásmidos codificantes para A3G, Vif y HDAC6 en células 293T, lisado del cultivo celular y análisis bioquímicos por *Western Blot*. Previo al abordaje de estos experimentos nos encontramos con el siguiente inconveniente: en base a nuestros resultados y nuestras conclusiones, la respuesta que observamos entre HDAC6/A3G/Vif se basa en un equilibrio que depende de la relación de cantidad de proteína de cada uno de ellos, en nuestros experimentos, las relaciones entre cantidad de plásmido transfectado de A3G y Vif eran de 2:1, y con respecto a HDAC6 era de 1:1 y 1:4 entre A3G y HDAC6 y de 1:2 y 1:8 para Vif y HDAC6. En cambio en los estudios del equipo del Dr. Paillart, para observar la inhibición de la traducción por bioquímica la relación de plásmido transfectado que habían establecido como óptima resultó 1:10 entre A3G y Vif. Por ello, decidimos modificar nuestras condiciones previas de trabajo y adaptarnos a las establecidas por el Dr. Paillart y su equipo, a pesar de que era posible que no observásemos nuestro efecto habitual debido al cambio en las proporciones entre cantidades de plásmido y por tanto de proteína final. Con respecto a la cantidad de plásmido de HDAC6, decidimos testar sólo una cantidad, en este caso 1 µg, quedándose las relaciones 1:10 entre A3G y HDAC6, y 1:1 entre HDAC6 y Vif. Además, en estos experimentos, la transfección de los plásmidos se realizó usando XtremeGENE 9 como vehículo, y dejando la transfección durante 24 horas antes de realizar la lisis

de las células. Dichas células se sembraron 24 horas antes de la transfección en placas de 6 pocillos, 700.000 células por pocillo. Finalmente, para observar la disminución de señal de la proteína A3G debido a la inhibición de la traducción por parte de Vif, 16 horas antes de la lisis, se añadió al medio de cultivo ALLN (inhibidor del proteasoma). Cuando co-transfectamos A3G y Vif en presencia de ALLN la señal de la proteína A3G es mayor que la observada en la condición con Vif y sin ALLN (en condición control con DMSO) debido a la inhibición de la degradación de la proteína por el proteasoma (**Fig. 1**, comparando la condición 4 con la condición 2), en cambio se observa una diferencia en negativo entre las condiciones de expresión de A3G sin y con Vif en presencia de ALLN (**Fig. 1**, comparando la condición 4 con la condición 3). Esta leve disminución de la señal de A3G es el resultado de la inhibición de la traducción de la proteína debido al efecto inhibitorio que ejerce Vif sobre su ARNm. Al repetir estas mismas condiciones pero co-transfectando además, HDAC6wt observamos que esta disminución en la banda de A3G no desaparece (**Fig. 1**, comparando la condición 8 con la condición 7). En la gráfica de cuantificación adjunta, se observa mejor que, en las condiciones con ALLN la presencia aumentada de HDAC6 no evita la bajada en la señal de A3G. La diferencia que se muestra entre las últimas barras de cuantificación no resultaron significativas. Estos resultados nos indican que HDAC6, a pesar de su actividad antiviral, descrita en este trabajo de tesis doctoral, no logra detener la inhibición de la traducción de la proteína A3G llevada a cabo por Vif, al menos bajo estas condiciones de trabajo.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01

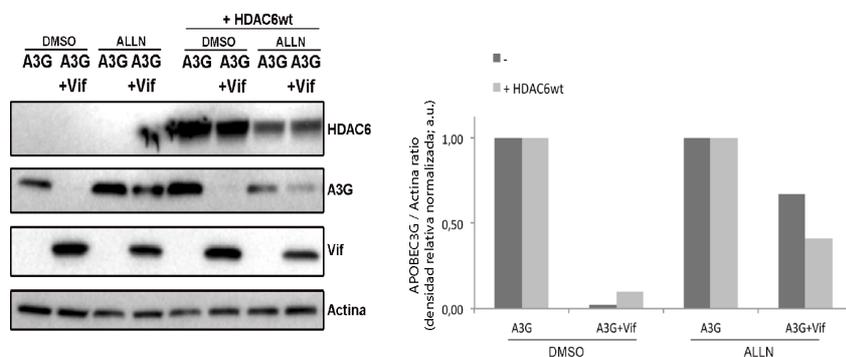


Figura 1: Estudio del efecto de HDAC6 sobre la inhibición de la traducción de A3G por parte de Vif.

Debido al corto período de estancia y que éstos no eran unos experimentos planificados con antelación no logramos profundizar más en este aspecto quedándose varias preguntas por responder. Por ejemplo, nos planteamos si podría existir un equilibrio entre las condiciones de observación por bioquímica del efecto pro-degradativo de HDAC6 sobre Vif y consiguiente protección de A3G y la observación, también por bioquímica, del efecto de inhibición de la traducción de A3G promovido por Vif. En las condiciones de trabajo del equipo del Dr. Paillart, la inhibición del proteasoma la realizan durante 16 horas antes de proceder a la recogida del cultivo celular, en cambio, en nuestro abordaje experimental el tiempo máximo de incubación fue de 5 horas. Desconocemos si esta gran diferencia en el tiempo de inhibición del proteasoma podría significar algún cambio en el equilibrio del proceso que intentamos observar. Además, el producto ALLN, aunque está descrito que inhibe el proteasoma, también posee actividad de inhibición de diferentes proteasas como son las calpaínas y catepsinas, algunas implicadas en la degradación de proteínas en los lisosomas, por lo que es posible que se estuviese afectando la degradación autofágica del proceso en esas

condiciones. Por tanto, hubiese sido interesante repetir dichos experimentos realizando una incubación de 5 horas con el inhibidor MG132 y observar qué respuesta obtendríamos. Otra valoración que nos planteamos se basa en el compartimento celular donde cada acción se lleva a cabo, es posible que la inhibición de la traducción de A3G mediada por la actividad de Vif se produjese en un compartimento celular no accesible para HDAC6, o quizás, se trate de un evento muy temprano tras la expresión de la proteína Vif, careciendo la proteína viral de ubiquitinaciones, modificación que reconoce HDAC6 para promover su degradación. Otro detalle que nos resultó relevante y que hubiésemos querido abordar fue el hecho de que aunque en todas las condiciones con HDAC6 se transfectó la misma cantidad de plásmido, en presencia del inhibidor ALLN la señal de HDAC6 disminuye, evento que se repitió en todos los experimentos (**Fig. 1**, comparando la señal de HDAC6 de las condiciones 7 y 8 con 5 y 6) y que no observamos cuando activamos la autofagia con el inhibidor MG132. ¿La presencia del inhibidor ALLN promueve algún evento celular que desencadene una degradación de HDAC6?, ¿una posible activación de la autofagia debido a la inhibición del proteasoma, deriva, en este caso, en la degradación de HDAC6?. Todas estas preguntas y los planteamientos que surgieron a raíz de los resultados quedaron lamentablemente sin responder, aunque consideramos que podría resultar muy interesante un abordaje de los mismos.

#### **HDAC6 promueve la degradación de la proteína Pr55-Gag sin afectar a su ARNm.**

Otra línea de investigación del equipo del Dr. Paillart, está enfocada en el estudio de las interacciones entre la proteína vírica Pr55-Gag (Gag) y el genoma del virus, como evento clave en la formación de la partícula viral y encapsidación del genoma vírico. Por ello, en el laboratorio se encontraba optimizado el protocolo

para la realización de qPCR del gen *gag*, los cebadores u oligos necesarios y anticuerpos para el control por bioquímica de los experimentos. Por ello, frente a esta oportunidad decidimos analizar si la afectación que habíamos observado de la señal de proteína Gag por la acción de HDAC6 exclusivamente se debía a un efecto sobre la proteína o si además, el ARNm de la misma se veía afectado, produciéndose por tanto menor cantidad de proteína a punto final.

En células 293T realizamos ensayos de co-transfección de los plásmidos pNL4-3-Luc-R-E- (1 µg) y HDAC6wt (0,5 y 2 µg) en placas de 6 pocillos donde 24 horas se había sembrado 700.000 células por pocillo. La transfección se realizó por duplicado con XtremeGENE 9 ya que se iba a testar el resultado mediante qPCR y mediante *Western Blot*. Tras 24 horas de transfección, recogimos las células y procedimos a su lisis y aislamiento de proteína total o de ARNm total. En el análisis de los resultados, observamos que, mediante bioquímica se producía el mismo comportamiento de disminución de Gag relacionada con una mayor presencia de HDAC6. Los resultados de la qPCR nos indicaron que, en cambio, los niveles de ARNm correspondientes a la proteína, no presentaban variaciones significativas entre condiciones (**Fig. 2**).

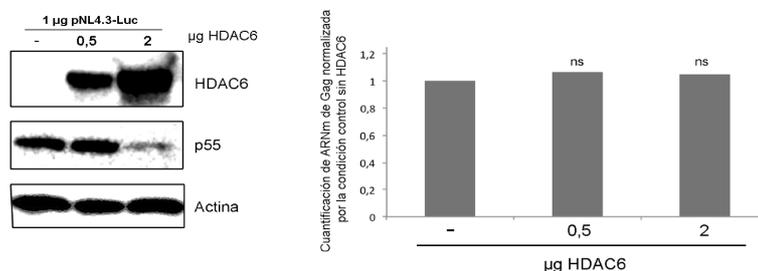


Figura 2: Resultados de la qPCR de cuantificación del ARNm de Pr55-Gag en presencia de HDAC6 normalizados por la condición control en ausencia de HDAC6. Se adjunta una imagen del Western blot control del experimento donde se evidencia el efecto ya observado de una disminución de la señal de la proteína Gag en presencia de cantidades crecientes de HDAC6.

Un resultado interesante, surgió en el primer experimento de este tipo que realizamos. En un primer momento, como fuente de Gag, utilizamos el plásmido pNL4.3-Δenv, ampliamente usado por el equipo del Dr.Paillart y que al carecer del gen de las proteínas de la envuelta resulta segura su expresión y manejo. El inconveniente surgió cuando al realizar los Western Blot control de las muestras, en los cuales esperábamos ver la tendencia de disminución de la señal Gag, no observamos dicho efecto (**Fig. 3 A**). Analizando qué diferencias podían existir entre este plásmido y el que habitualmente usamos en nuestro laboratorio, vimos que, aunque ambos carecen del gen *env*, nuestro plásmido posee el gen de la Luciferasa insertado donde el gen de las proteínas de la envuelta, pero afectando también a los genes *nef* y *vpr*. Por lo tanto, la expresión de este plásmido no conlleva la expresión de estas proteínas. Temiendo que esas diferencias estuviesen afectando a nuestro experimento, decidimos usar un plásmido pNL4-3.Luc.R'E idéntico al que usamos en nuestro laboratorio. En este caso sí observamos la acción pro-degradativa de HDAC6 sobre Gag (**Fig. 2**). Independientemente del plásmido usado como fuente de Gag, la cuantificación por qPCR del ARNm de la proteína viral no

presentaba variaciones significativas debido a la presencia aumentada de HDAC6 (Fig. 3 B). Consideramos de gran interés seguir ahondando en esta aparente pérdida de la función anti-VIH de degradación de Gag debido al cambio del plásmido usado como fuente de Gag, por ejemplo, analizar si el cambio de respuesta debido a la presencia o ausencia de Nef y/o Vpr es significativa o debido a un resultado aleatorio del ensayo.

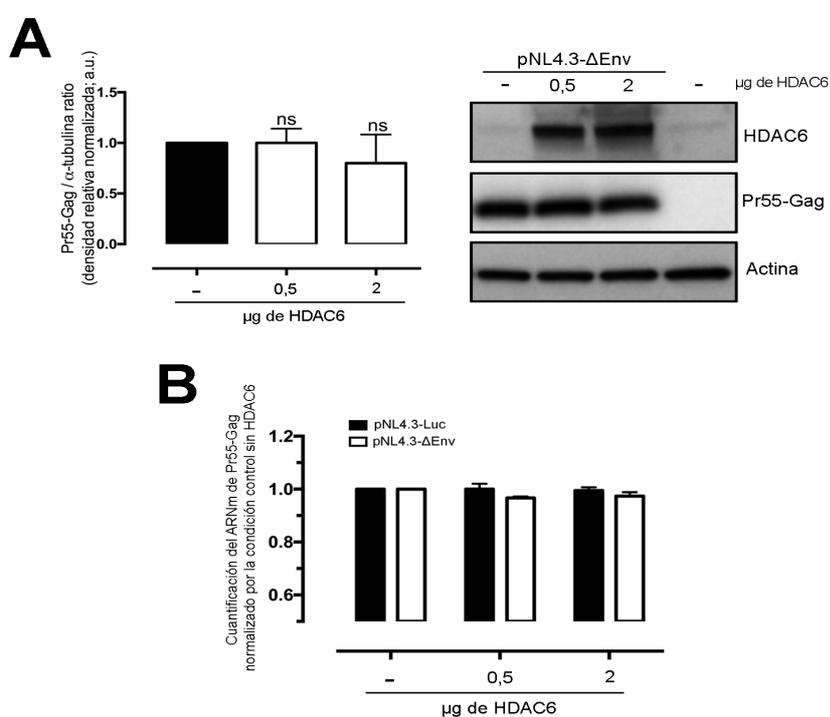
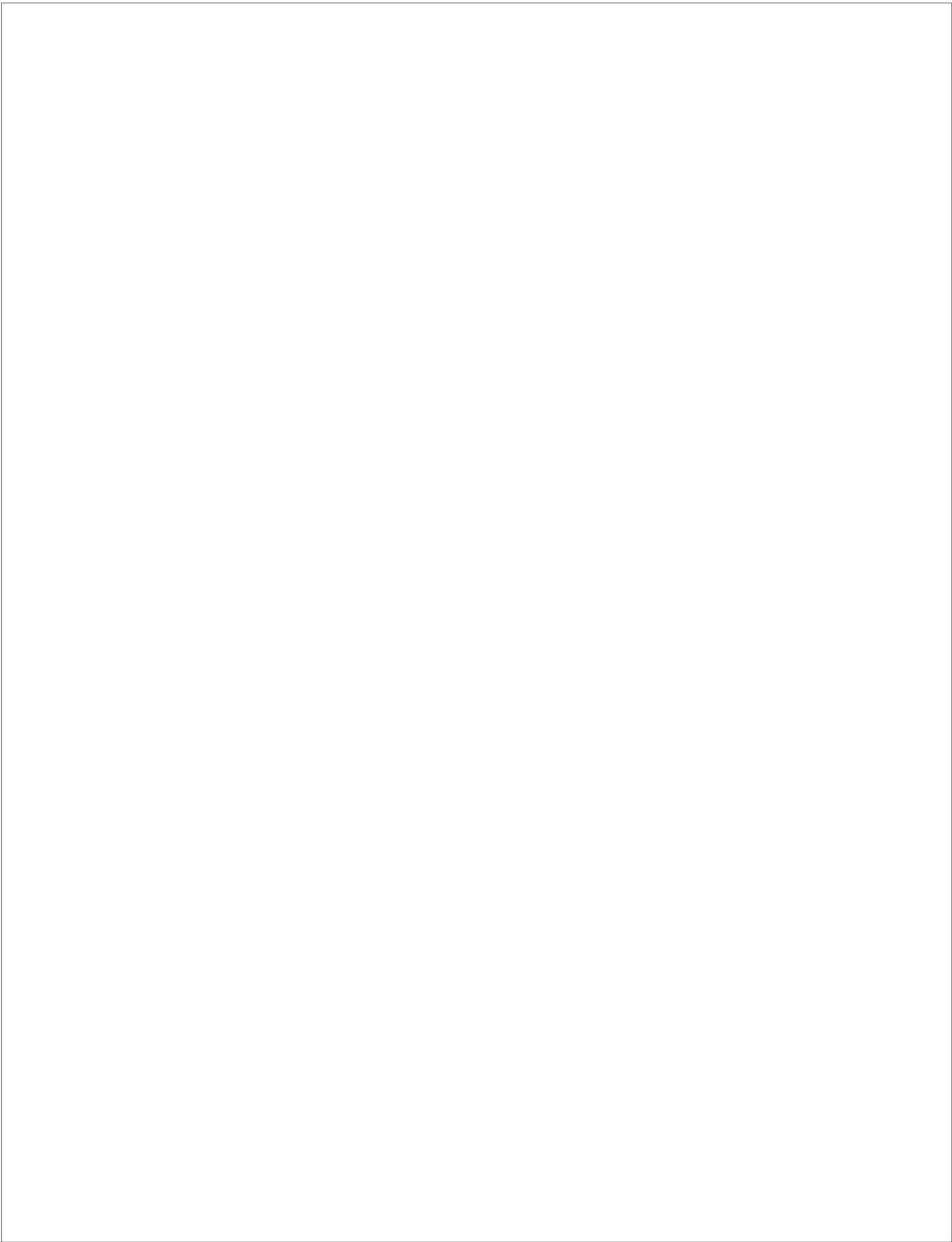


Figura 3: A) Imagen de Western Blot y cuantificación adjunta de los niveles de proteína Gag en presencia de HDAC6wt, usando como origen de producción de Gag el plásmido pNL4.3- $\Delta$ env. B) Cuantificación del ARNm de Gag en presencia de HDAC6 normalizado por la condición control sin HDAC6 sobre-expresado. Se representa los experimentos realizados con pNL4.3-Luc-R-E- (barras negras) y pNL4.3- $\Delta$ env (barras blancas).



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 920173

Código de verificación: eNY3eylt

Firmado por: LAURA DE ARMAS RILLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 01/06/2017 15:58:11

AGUSTIN VALENZUELA FERNANDEZ  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

02/06/2017 11:29:41

ERNESTO PEREDA DE PABLO  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

06/06/2017 19:00:01