

**Proteínas celulares cómplices de las proteínas regulatorias y accesorias del VIH-1**María Eugenia Castaño, Bact.<sup>1</sup>, Silvio Urcuqui, Biol., M.Sc., Ph.D.<sup>2</sup>**RESUMEN**

*La resistencia del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) a medicamentos antivirales ha presionado la búsqueda de métodos alternativos de terapia. En esta revisión, se presenta un análisis de los avances más recientes en el estudio de la interacción entre las proteínas regulatorias y accesorias del VIH-1 con factores celulares, sus efectos en la célula huésped y los beneficios para el virus. Se muestra cómo estas proteínas virales alteran procesos fundamentales de la célula huésped de manera muy precisa y las utilizan para aumentar la replicación viral, evadir la respuesta inmune del hospedero y causar enfermedad.*

Palabras clave: Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. Proteínas. Patogénesis. SIDA.

El virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA) es un retrovirus miembro del género de los lentivirus. Su genoma, además de presentar genes que codifican para las proteínas estructurales gag, pol y env, comunes a los otros retrovirus, codifica 6 proteínas accesorias/regulatorias Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu y Nef comprometidas en la regulación de la infección, producción viral y patogenicidad<sup>1-3</sup>.

Durante la infección el VIH-1 utiliza múltiples factores celulares para su ciclo de vida y establece una interrelación con la célula y el hospedero; incluso se vale de algunas proteínas celulares para causar enfermedad (patogénesis) y como herramienta para favorecer la infección. En la infección por VIH-1, tanto *in vivo* como *in vitro*, se afecta un gran número de funciones de las células del sistema inmune, incluyendo la quimiotaxis, fagocitosis, muerte intracelular y producción de citoquinas en los monocitos/macrófagos.

Un claro ejemplo es la modulación por parte de las proteínas virales Nef, Vif, Vpu, Vpr y Rev de VIH-1, de un

número importante de vías de señalización a través de interacciones con el citoesqueleto y proteínas citoplásmicas<sup>4</sup>. Otro ejemplo de cómo las proteínas virales afectan la célula hospedera es la regulación de la expresión en la membrana celular de receptores como el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC-I), regulado por tres proteínas virales en diferentes niveles, la proteína Tat que inhibe la transcripción de MHC-I, Vpu que retiene las cadenas peptídicas nacientes de MHC-I en el retículo endoplásmico y Nef que media la internalización selectiva de moléculas desde la membrana plasmática<sup>5</sup>.

**Tat, un inductor de la transcripción de genes celulares.** El alto nivel de transcripción del ADN del VIH-1 integrado en el genoma del hospedero (provirus), es regulado por una proteína viral de aproximadamente 14 kD llamada Tat. Tat es un activador específico inusual que reconoce un ARN altamente estructurado presente en los transcritos nacientes, lo que permite estimular la transcripción del provirus. En ausencia de Tat en las células infectadas las proteínas celulares

inician la transcripción del genoma del VIH-1, pero la mayoría de transcritos sólo alcanzan entre 50 y 60 nucleótidos, que luego son degradados. Esto significa que la transcripción de todo el genoma viral es muy deficiente. Una vez se ha sintetizado la proteína Tat a partir de un primer ARNm viral completamente procesado, ésta interactúa con la estructura TAR ARN presente en los transcritos nacientes, activa la elongación de los transcritos virales y por ende, una eficiente transcripción de la totalidad del genoma viral. Por tanto, la proteína Tat es un factor transcripcional, con un dominio de activación en la región central que funciona en forma independiente del dominio de unión a ARN<sup>4,6</sup>.

La actividad de la Tat es dependiente de la estructura TAR (por Tat Activation Region), presente en el extremo 5' de los ARN virales nacientes. Si bien la transcripción del VIH-1 es mediada por la ARN polimerasa II celular, la función principal de Tat es a nivel de la elongación de la transcripción. Por tanto, la Tat juega un papel fundamental en la regulación de la transcripción total del genoma y de la replicación del VIH-1<sup>4</sup>. En este artículo se tratará en primer lugar el papel de Tat en la transcripción del genoma viral y luego su función en la patogénesis.

**Tat en la transcripción viral.** Va-

1. Estudiante de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia, Medellín. e-mail: mcastano@virologia.udea.edu.co

2. Profesor Auxiliar, Corporación BIOGÉNESIS, Universidad de Antioquia, Medellín. e-mail: surcuqui@virologia.udea.edu.co

Recibido para publicación septiembre 30, 2003 Aprobado para publicación marzo 12, 2004

rios investigadores identificaron un complejo proteico celular llamado TAK (Tat Associated Kinase) que se une al dominio de activación de Tat una vez que ésta interactúa con su ligando Tar y permite la formación de un complejo capaz de fosforilar el dominio carboxi-terminal (CTD) de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (ARNPII)<sup>4,7</sup>. Se demostró que TAK era el mismo complejo que previamente se había llamado PITALRE, expresado de manera ubicua en tejidos humanos, implicado en la elongación de la transcripción. PITALRE había sido renombrado Cdk9 porque se relacionaba con la familia de quinasas dependientes de ciclinas (Cdk).

Por el papel que desempeña Cdk9, se buscó una ciclina que pudiera conferirle a TAK especificidad por su sustrato y se identificó la ciclina T (Cyt). Luego se determinó que Cyt aumenta la especificidad de Tat por TAR, lo que incrementa su actividad y es necesario para la elongación de los transcriptos *in vitro*<sup>4</sup>. Este complejo también se conoce como factor positivo de elongación de la transcripción b (P-TEFb)<sup>6,7</sup>. Por análisis de secuencia de aminoácidos, se especuló que PITALRE y P-TEFb eran homólogas o que P-TEFb formaba parte de PITALRE<sup>6</sup>. Aunque se han descrito otros factores que interactúan con Tat-TAR y que posiblemente contribuyen a la transcripción de VIH-1, la interacción de Tat y TAR con Cdk9-Cyt parece ser crítica en la progresión de la transcripción<sup>8</sup>.

También se ha descrito la interacción de Tat con otros factores de transcripción incluyendo los factores de transcripción IIIH (TFIIH) e IIF (TFIIF). Gracias a estas interacciones, Tat estimula la fosforilación del dominio CTD de la RNAPII. La fosfatasa FCPI es capaz de defosforilar el dominio CTD de la RNAPII; sin embargo, algunos investigadores<sup>7</sup> han descrito que gracias a la

interacción Tat-FCPI se inhibe dicha defosforilación.

Tat también recluta a la enzima responsable del encapuchamiento del mARN de mamíferos (Mce1) y a la metiltransferasa cap (Hcm1). El reclutamiento de estas enzimas hacia TAR aumenta la eficiencia de formación del encapuchamiento en el ARN transcrito<sup>9,10</sup>. Ambas, en asociación con la ARNPII dependiente de la fosforilación de CTD, trabajan en la elongación de los transcriptos. La modificación postranscripcional de encapuchamiento del mARN de VIH-1, es fuertemente estimulada por la región C-terminal de Tat, que interactúa directamente con Mce1. También se ha descrito que Tat puede ser acetilada al interactuar con diferentes tipos de histona acetil transferasa (HATs), incluyendo el complejo CBP/p300, PCAF y Hgc5<sup>8,11</sup>, que afecta la expresión génica tanto viral como celular<sup>12</sup>.

En resumen, gracias a la capacidad del complejo Tat-TAR de interactuar con quinasas celulares, promueve la transcripción de mARN virales completos, que luego son transportados al citoplasma para la expresión de las proteínas virales necesarias para producir una nueva progenie viral infecciosa<sup>7</sup>.

**Tat y patogénesis.** Se ha demostrado que Tat se une con Egr-2 y 3 y aumenta la transactivación del promotor de Fas ligando (FasL) mediada por Egr; esta sobre-regulación de FasL podría contribuir a la apoptosis de células T durante la infección por VIH-1<sup>7</sup>.

Por el contrario, Zhang M. *et al.*<sup>13</sup> lograron determinar que la infección por VIH-1 sobre-regula tanto los niveles de mARN de Bcl-2 como de la proteína misma, empleando un sistema de cultivo de macrófagos derivados de monocitos humanos; al regular la producción de esta proteína antiapoptótica podría estar protegiendo las células infectadas de la muerte por esta vía.

La interacción de Tat con la Mn-superóxido dismutasa (Mn-SOD) también parece tener un efecto en la patogénesis de VIH-1. Tat reprime la expresión de Mn-SOD al elevar el estrés oxidativo, lo que aumenta la proliferación celular, la apoptosis o altera la actividad de proteínas que contienen tiolato de zinc, como Sp1<sup>7</sup>.

Tat interactúa además con Pur  $\alpha$ , una proteína celular comprometida en la transcripción. Esta interacción está ligada con la activación de virus que causan infecciones oportunistas en pacientes con SIDA y con la transactivación de LTR de VIH-1. La interacción de Tat con el factor de transcripción NFAT1, PKC y con el complejo cooperativo rel/AP1 puede estar implicada en la alteración de la producción de citoquinas como IL-10 e IL-2<sup>7</sup>.

La exposición de cultivos celulares de diferente origen (sistema nervioso central y células T) con extractos altamente purificados de Tat, eleva la actividad transcripcional de constructos reporteros que contienen promotores del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF $\beta$ -1), del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y el LTR del VIH-1; además de esto, el tratamiento resultó en un aumento en el nivel de mARN de TGF $\beta$ -1 y TNF $\alpha$  en estas células<sup>14</sup>. Otros investigadores confirman estos hallazgos al informar que durante la progresión a SIDA, se eleva la expresión de varias citoquinas comprometidas en la transducción de señales tales como TGF $\beta$ -1, y de citoquinas proinflamatorias incluyendo MCP-1<sup>15</sup>. El aumento de estas citoquinas es mediado, al menos en parte, por la proteína Tat del VIH-1.

La inhibición de la expresión de MHC-I mediada por Tat probablemente se debe a una interacción directa con TAFII250, una subunidad de TFIID que impide que éste se una a la caja Sp1, interacción indispensable para la acti-

vidad del promotor de MHC-I<sup>5</sup>.

Se ha descrito también que Tat es capaz de interactuar con otras proteínas celulares, pero se desconoce si esta interacción está relacionada o no con alguna función específica entre otras la interacción con Tip110, con la proteína de unión a Tat 1, con el factor estimulador de Tat 1 (Tat-SF1), con el dominio POZ de la proteína FBI-1, con el receptor nuclear coactivador de la proteína GRIP1, proteína GLI-2, con el factor de elongación Spt5 y con la proteína de unión a ADN/ARN de cadena sencilla YB-1<sup>7</sup>.

**Vpr: una máquina de control del ciclo celular.** El VIH-1 tiene la particularidad de replicarse en células que no están en división activa. La proteína viral Vpr, de aproximadamente 14 kDa, es probable que juegue un papel muy importante en la inhibición de la expansión clonal al permitir la detención de la célula en la fase G2 del ciclo celular, etapa donde el LTR del VIH-1 es más activo<sup>4,16</sup>. Sólo la expresión de Vpr es suficiente para alterar el ciclo celular. Además, Vpr es un transactivador débil del LTR del VIH-1 y de otros promotores virales homólogos, como el del virus Epstein Barr y el de citomegalovirus<sup>17</sup>.

Sherman *et al.*<sup>19</sup>, caracterizaron a la Vpr como una proteína nucleocitoplásmica con dos señales de importación y una señal de exportación nuclear dependiente de exportina-1 y nucleoporina. Mutaciones en el NES de la Vpr debilitan su incorporación en el nuevo virión<sup>4,18</sup>. También ellos demuestran que la secuencia de exportación nuclear (NES) de Vpr es requerida para una eficiente replicación de VIH-1 en macrófagos.

Se ha demostrado que virus naturalmente no infecciosos o virus defectuosos gracias a inhibidores de la transcripción reversa o proteasa, son capaces de parar el ciclo celular; esos resultados

sugieren que tanto los virus infecciosos como los no infecciosos *in vivo* así como aquellos circundantes de las células dendríticas foliculares participan en la supresión inmune, gracias a la acción de Vpr<sup>20</sup>.

Vpr induce la diferenciación celular incluyendo la activación de la transcripción de genes celulares; induce la inhibición del crecimiento de cultivos celulares primarios y varias líneas celulares de origen tumoral, aún en ausencia de otras proteínas virales, mediante un bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M<sup>21</sup>. En 1998 se identificó un factor celular que interactúa con Vpr, denominado hVIP/MOV34 (proteína humana que interactúa con Vpr) que es idéntico al mov34, una proteína perteneciente a la familia de factores reguladores de la transcripción, miembros de la familia de proteasoma y proteínas celulares comprometidas con la transición de la fase G2/M del ciclo celular en mamíferos<sup>22</sup>. En este mismo trabajo demuestran una asociación entre la inducción de parada del ciclo celular en G2/M inducida por Vpr y un cambio en la localización subcelular de hVIP/MOV34 desde el núcleo a una localización perinuclear. El proceso está asociado con una inhibición de la maduración promovida por factores asociados con la actividad quinasa de la histona H1. Ramanathan *et al.*<sup>23</sup>, demuestran que la región carboxiterminal de hVIP es crítica para su interacción con Vpr.

Mediante ensayos de inmunoprecipitación, Sawaya *et al.*<sup>24</sup> lograron determinar que la Vpr interactúa con Sp-1 y con P53, posiblemente formando un complejo tripartita; P53 es otro elemento clave en el control del ciclo celular.

**Vpr y la importación hacia el núcleo.** El complejo de preintegración de VIH-1 (VIH-1 CPI) entra en el núcleo atravesando el canal acuoso central del complejo del poro nuclear. El VIH-1

CPI presenta tres proteínas nucleofílicas, matriz, integrasa y Vpr. Parece ser que la Vpr actúa en una faceta complementaria para aumentar la importación del CPI al núcleo celular en ausencia de división<sup>25</sup>. Ensayos de colocalización celular realizados por Vodicka *et al.*<sup>16</sup> mostraron que Vpr se encuentra en el complejo de poro nuclear (NPC), con Nsp1p y con Nup159p. Describen que Vpr no sólo colocaliza con la importina- $\alpha$  y Nsp1p, sino que interactúa con ellas; sugieren además que la localización nuclear de Vpr obedece a su tamaño pequeño más que a su capacidad de entrar al núcleo, pues la proteína heteróloga  $\beta$ -galactosidasa fusionada con Vpr no pudo ser translocada al núcleo por esta proteína viral. Vpr puede interactuar específicamente con la región FG (repeticiones de fenilalanina-glicina) de la nucleoporina Pom121<sup>18</sup>, que forma parte del CPN.

**Interacción de Vpr con otras proteínas celulares.** Se ha descrito que Vpr interactúa con la uracil ADN glicosilasa (UNG), una enzima de reparación comprometida con la remoción del uracilo en el ADN, pero no afecta su actividad enzimática<sup>1</sup>. Estudios<sup>17</sup> *in vitro* han mostrado que la Vpr se une con la proteína citosólica Rip-1 e induce su translocación al núcleo; posiblemente Rip-1 es una proteína transportadora que lleva a Vpr al núcleo. Además, Vpr y Rip-1 coinmoprecipitan con el receptor de glucocorticoides humano como parte de un complejo activado de receptor. Estos datos podrían incluir a Vpr en la vía transcripcional mediada por el receptor de glucocorticoide.

**Rev, proteína viral crucial en la exportación de transcritos de VIH-1 sin procesar.** La proteína viral Rev es funcional en una amplia variedad de células eucariotes, incluyendo levaduras, *Drosophila*, huevos de *Xenopus* y mamíferos. Esto sugiere que los

cofactores celulares que interactúan con Rev podrían ser proteínas conservadas evolutivamente, esenciales para la función de células normales<sup>3</sup>.

Similar a Tat, la proteína Rev participa en la regulación de la expresión del genoma de VIH-1, es decir, se requiere de Rev para la expresión de la mayoría de las proteínas de VIH-1 necesarias para el ensamblaje de partículas virales infecciosas<sup>3</sup>. VIH-1 una vez integrado al genoma (estado proviral) genera tres tipos diferentes de mARN según su procesamiento: de 9 kb (no procesados) que codifica para las proteínas gag y gag/pol; de 4 kb (semiprocados) que codifican para env, vif y vpu, y de 2 kb (completamente procesados), que codifican para las proteínas Tat, Rev y Nef<sup>26</sup>; en consecuencia, todos estos transcritos son necesarios para una eficiente síntesis de proteínas virales en el citoplasma. Es de anotar que la mayoría de los ARNs celulares sin procesar son retenidos en el núcleo, donde se maduran o degradan; por tanto, los mARNs virales de 9 y 4 kb, deben ser exportados al citoplasma por mecanismos adicionales<sup>3,27</sup>. Para resolver este problema, el genoma del VIH-1, cuenta con la proteína Rev, que tiene la capacidad de interactuar con la estructura RRE (Rev Response Element) presente en los transcritos virales que muestran intrones y los exporta al citoplasma en asociación con ciertas proteínas celulares, a través del CPN<sup>28</sup>. Rev específicamente induce la acumulación de estos transcritos en el citoplasma<sup>27</sup>.

La proteína Rev, de aproximadamente 18 kDa, consiste de un dominio aminoterminal rico en arginina, que participa en tres funciones diferentes: interactuar con RRE, en la homodimerización que se produce en respuesta a la unión con el RRE y como una señal de localización nuclear (NLS). En la región carboxiterminal presenta un dominio efector rico en leucina, que fun-

ciona como una NES, dependiente de la exportina 1. La nucleoporina humana hRIP/Rab interactúa específicamente con el dominio efector de Rev<sup>27</sup>. Los resultados obtenidos por Fritz *et al.*<sup>27</sup> sugieren que el dominio efector de Rev mimetiza las NES de las proteínas celulares porque la NES de PKI puede reemplazar funcionalmente el dominio efector de Rev, gracias a su interacción con hRIP/Rab. El papel de PKI en la célula todavía no es claro, pero esta proteína puede entrar al núcleo e inhibir las funciones nucleares de la proteína quinasa dependiente de cAMP.

Venkatesh *et al.*<sup>29</sup>, demostraron que la REBP (Rev/Rex effector binding protein) es capaz de aumentar la expresión de un gen reportero dependiente del complejo Rev-RRE, ya sea en forma independiente o en forma cooperativa con hRIP/Rab. Además, los autores sugieren que REBP podría funcionar como un mediador de la función de NES de Rev y participar en la exportación del ARN durante la infección viral.

#### **Translocación citoplasma-núcleo.**

La proteína Rev es translocada hacia el núcleo gracias a la NLS presente en la región C-terminal de la proteína, que es reconocida por la importina  $\alpha$  (también conocida como carioferina  $\alpha$ ), que a su vez se une a un segundo factor de importación, la importina  $\beta$  (o carioferina  $\beta$ ) (Gráfica 1). Se ha demostrado que en el ingreso de Rev al núcleo también participa la fosfoproteína B23 que interactúa con la NLS<sup>28,30</sup>. También se ha descrito que moléculas de ARN son capaces de inhibir la importación de Rev hacia el núcleo en células permeabilizadas<sup>31</sup>, gracias a la inhibición de la interacción entre el dominio rico en arginina de Rev y la importina  $\beta$ .

**Exportación de transcritos virales semimaduros y sin madurar.** El mecanismo molecular para la exportación nuclear mediada por Rev ha sido objeto de intenso estudio, lo que ha permitido

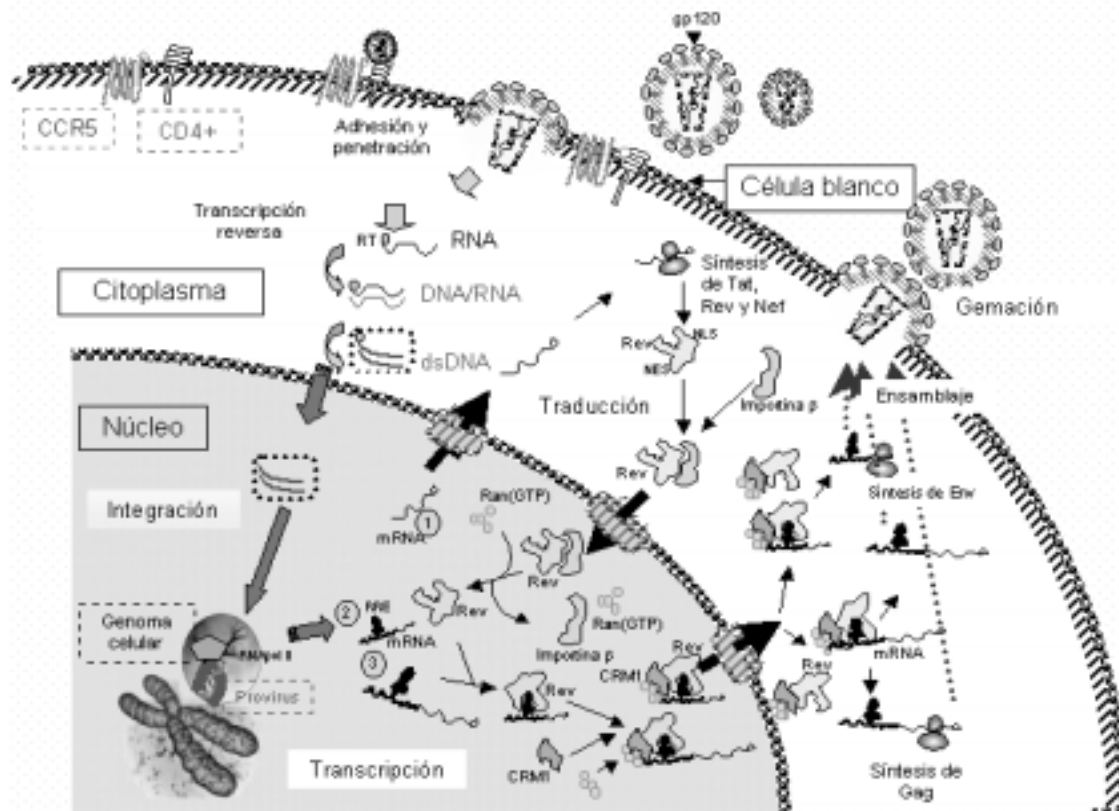
comprender muchos procesos utilizados por la misma célula y profundizar en el conocimiento de la relación virus-hospedero.

Una vez se identificó a Rev como la proteína responsable de la exportación de los transcritos virales, muchos grupos se dieron a la tarea de encontrar las proteínas celulares implicadas en esta función. La primera proteína identificada fue la exportina 1. El análisis de la secuencia primaria de la exportina 1/Crm1 demostró que es miembro de la superfamilia de importina- $\beta$  (karioferina- $\beta$ ), receptores comprometidos en el transporte nuclear<sup>4</sup>.

En el núcleo, una vez Rev se une a mARN que contiene RRE (Gráfica 1), al menos dos proteínas solubles celulares se asocian con este complejo: CRM1 y Ran, para formar el complejo de exportación. También se ha demostrado que la NES de Rev interactúa cooperativamente *in vitro* con la exportina 1 y Ran guanosina trifosfato (GTPasa), un factor esencial de transporte nuclear, de una manera que requiere que Ran esté en su forma unida a GTP<sup>4</sup>. La primera asociación entre Rev y la exportina1/Crm1 se realizó usando la citotoxina leptomicina B (LMB), porque inhibe la exportación de mARN dependiente de una NES en cultivos celulares, sugiriendo que el complejo Rev/RRE-CRM1-RanGTP es sensible a esta citotoxina<sup>32</sup>.

Este complejo terciario (Rev-RRE-CRM1) interactúa con algunas nucleoporinas presentes en el complejo del poro nuclear, lo que al final resulta en la translocación del mARN viral sin procesar del citoplasma.

Mediante el sistema de doble híbrido en levadura, se identificaron 2 grupos de proteínas que interactúan con Rev en forma dependiente de la NES: hRip (human Rev-interacting protein) y Rab (Rev/Rex activation domain-binding protein)<sup>28</sup>; hRIP es una proteí-



Gráfica 1. Representación esquemática de la replicación del VIH-1. Una vez el virus penetra en el citoplasma, la transcriptasa reversa (RT) viral transcribe el material genético en una molécula de ADN, el cual es transportado al núcleo como un complejo de preintegración. En el núcleo, el ADN es integrado en el cromosoma celular y se conoce como provirus; utilizando el provirus como matriz, la ARN polimerasa Pol II celular transcribe tres tipos de mARN. El número 1 representa el mARN completamente procesado, que da origen a las proteínas Tat, Rev y Nef. Los números 2 y 3 representan el mARN semiprocesado y sin procesar, que son exportados hacia el citoplasma, por la proteína Rev, la cual interactúa con la estructura RRE presente en ese tipo de mRNAs. Una vez formado el complejo Rev-RRE, recluta algunas proteínas celulares (CRM1) implicadas en la importación y finalmente los mARN son exportados a través del complejo del poro nuclear. Una vez en el citoplasma, los transcritos son reconocidos por los ribosomas y se sintetizan las respectivas proteínas (ver texto).

na que forma parte de la vía de exportación de proteínas del núcleo al citoplasma. La sobre-expresión de hRIP/Rab en células de mamífero, aumenta la actividad de Rev<sup>27</sup>.

Se ha demostrado que diferentes proteínas se unen al dominio de activación de Rev, entre ellas Rip1p (proteína celular de levadura que hace parte del complejo del poro nuclear) y su homólogo en mamíferos, hRIP/Rab y el factor de iniciación eucariótico 5A (eIF-5A), cuya interacción interviene en la exportación de los transcritos virales sin madurar<sup>27,33,64</sup>.

#### **Rev y el procesamiento de mARN.**

Se han descrito otros factores celulares que interactúan con Rev. Las proteínas YL2 (murina) y su homólogo humano p32 interactúan con el dominio básico de Rev (el mismo dominio que interactúa con RRE) y contribuye al proceso de oligomerización<sup>3</sup>. La proteína p32 se asocia con ASF/SF2, un factor esencial en el *splicing* y se ha hipotetizado que contribuye como un puente con la maquinaria celular de *splicing*<sup>3</sup>.

Powell *et al.*<sup>35</sup> demostraron que ASF/SF2 (miembro de la familia de proteínas serina-arginina -SR- comprometida en la regulación del procesamiento del mARN) interactúa específicamente

con una subregión de RRE *in vitro*, de manera dependiente de Rev; la sobre-expresión de SF2/ASF y SC35 inhiben la función de Rev y la replicación viral<sup>36</sup>. Esos resultados sugieren que en la inhibición del procesamiento de los transcritos virales Rev induce un salto de los exones gracias a una interacción simultánea de Rev y proteínas SR con RRE, lo que altera el subsecuente ensamblaje y actividad catalítica del complejo de procesamiento. También se ha demostrado que la interacción de Rev con hTra2a (miembro de la familia SR) estimula las funciones de Rev, sin alterar o bien aumentando la concentración

de ARN<sup>26</sup>.

**Vpu y Nef modulan la señalización celular.** La glicoproteína de envoltura ENV se une al receptor celular CD<sub>4</sub> no sólo en la superficie celular sino también en el retículo endoplásmico (RE) antes de la translocación de la proteína viral con la membrana plasmática<sup>37</sup>. Por esto, el genoma de VIH-1 codifica tres proteínas, Vpu, Nef y gp120, que regulan negativamente la expresión de CD<sub>4</sub> en la superficie de la célula durante la infección viral para expresar así sus glicoproteínas de envoltura en la membrana celular. VIH-1 ha desarrollado estrategias tanto para remover su receptor CD<sub>4</sub> de la superficie (Nef) como para evitar que el receptor recién sintetizado llegue a la superficie celular (Vpu).

Se ha informado además que tanto Vpu como Nef regulan negativamente la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I<sup>38</sup>. Así, VIH-1 ha desarrollado diversos mecanismos para perturbar el tráfico intracelular de proteínas del hospedero con el propósito de aumentar la virulencia de la partícula viral y escapar de la vigilancia inmune.

**Vpu como regulador.** Vpu es una proteína de aproximadamente 16 kDa, con un dominio hidrofóbico de anclaje a la membrana y una cola citoplásmica polar fosforilada. Se han establecido dos funciones principales para Vpu: degradación de CD<sub>4</sub> y aumento en la liberación de las partículas virales de la membrana plasmática<sup>38</sup>. Vpu se une con CD<sub>4</sub> en el RE y lo hace blanco de proteólisis en el citosol por la vía ubiquitina-proteasoma<sup>39,40</sup>. La conexión directa entre Vpu y el proteasoma se estableció demostrando que Vpu se une a la proteína celular  $\beta$ -TrCP, que a su vez se une con el factor blanco del proteasoma Skp1p.  $\beta$ -TrCP interactúa con Vpu y su reclutamiento en la membrana requiere de la fosforilación de los

residuos serina 52 y serina 56 presentes en el motivo de fosforilación DSGXXS de Vpu, esenciales para la degradación de CD<sub>4</sub><sup>41</sup>; la responsable de esta fosforilación es la caseína quinasa II (CKII)<sup>40,42</sup>. La interacción de Vpu con  $\beta$ -TrCP se realiza a través de regiones WD repetidas que se encuentran en la región C-terminal de  $\beta$ -TrCP y gracias a una caja F presente cerca de la región N-terminal implicada en la interacción con SKPIP. Mutaciones de la caja F de  $\beta$ -TrCP tienen un efecto dominante negativo sobre la degradación de CD<sub>4</sub> mediado por Vpu<sup>40</sup>.  $\beta$ -TrCP es un componente del complejo ligasa ubiquitina E3. La importancia de estas interacciones se confirmó con el aislamiento de un complejo terciario CD<sub>4</sub>-Vpu- $\beta$ -TrCP *in vivo*<sup>39</sup>. Esta interacción regula la degradación de I $\kappa$ B- $\alpha$ , teniendo efecto al final en los genes regulados por NF- $\kappa$ B y en la inducción de apoptosis<sup>43</sup>. También se ha descrito que Vpu inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B interfiriendo con la degradación mediada por  $\beta$ -TrCP de I $\kappa$ B- $\alpha$ <sup>42</sup>.

Además de esta función, se ha descrito que Vpu puede disminuir la expresión de MHC-I en la membrana citoplásmica<sup>5,38,44</sup>. Esto significa que al degradar los CD<sub>4</sub> y afectar el MHC-I, Vpu permite por un lado preservar la infectividad viral y al mismo tiempo promueve la evasión del sistema inmune.

**Nef, otro factor de virulencia.** Entre los productos génicos de VIH-1 implicados en la modulación de la señalización celular, Nef parece ser el más potente. Se considera el factor principal de virulencia tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>45</sup>. Nef es una pequeña proteína de 27 kDa, requerida tanto para la replicación máxima del virus como para la progresión de la enfermedad, mediante el control de los factores de señalización de la célula<sup>46</sup>. Se ha demostrado que defectos y variaciones en el gen que codifica para esta proteína, son

responsables de una rápida, lenta o no progresión del SIDA<sup>47</sup>. Nef es una proteína de 206 aminoácidos con grupos miristilo, que se expresa de forma abundante durante la infección por VIH-1 y se localiza en la membrana plasmática, el citoplasma, el núcleo y dentro del virión<sup>46</sup>. Esta miristoilación en la región aminoterminal de Nef y el dominio de unión a SH3 rico en prolina, sugieren que esta proteína podría interactuar con proteínas del hospedero en la membrana plasmática<sup>45</sup>.

Nef además remueve CD<sub>4</sub> que ya está en la superficie celular, al acelerar la endocitosis a través de vacuolas cubiertas de clatrina<sup>48</sup>. Algunos autores sugieren que la endocitosis ocurre a través de interacciones entre Nef y un complejo proteico, el complejo adaptador AP-2, que recluta proteínas transmembrana a vacuolas recubiertas con clatrina. Específicamente, se encontró que Nef colocaliza con el complejo AP-2 en la membrana plasmática y que se une a sus subunidades directamente<sup>48</sup>.

Nef se une al complejo de proteínas adaptadoras (AP) de las vesículas cubiertas, induciendo la expansión del compartimento endosomal y alterando la expresión en la membrana celular de proteínas como CD<sub>4</sub>, CD<sub>28</sub> y MHC-I; es decir, Nef al igual que Vpu, es capaz de regular negativamente la expresión de estos receptores para alterar el estado de activación de las células T, aumentando así la infectividad de la partícula viral<sup>49</sup>.

Aunque son algo confusos los aspectos específicos de la alteración de la cascada de señalización de células T por Nef, se ha descrito que Nef altera la vía de señalización de los receptores de células T (TcR), lo cual es crítico en la patogenicidad del SIDA<sup>50</sup>, la señalización a través del receptor de IL-2 y las vías que llevan a la producción de quimioquinas-monoquinas en macrófagos, así como múltiples cascadas anti-

apoptóticas<sup>46</sup>. Concomitante con la alteración de la vía de activación de TcR, se presenta una sobre-regulación del factor de muerte Fas ligando, lo que le permite a la célula infectada entrar en contacto con células no infectadas e inducir su muerte<sup>46</sup>.

Algunos estudios sugieren que Nef afecta la vía de activación de Fas a través de la inactivación de las caspasas 3 y 8<sup>46</sup>. El efecto de Nef sobre el MHC-I tiene como propósito proteger las células infectadas del reconocimiento de los linfocitos T citotóxicos<sup>51</sup>, mediante una modulación negativa de HLA-A y B, cuya permanencia evita el reconocimiento por parte de las NK. Williams *et al.*<sup>51</sup> muestran por primera vez que Nef funciona como un adaptador capaz de unir el MHC-I con proteínas implicadas en el tráfico celular. El mecanismo comprometido en la regulación de MHC-I por Nef sugiere que esta proteína viral, en asociación con PACS, arrebatada la vía endocítica de ARFG, por un proceso dependiente de PI3K y regulación negativa del MHC-I, de la superficie celular del sistema trans-golgi<sup>52</sup>. En este proceso están involucrados tres motivos de Nef: una región ácida, un dominio SH3 y un motivo M, que controlan la salida de PACS-1 del sistema de trans-golgi, la activación de ARF6 y el secuestro en la parte interior del sistema trans-golgi de MHC-I respectivamente.

Se ha descrito además que Nef estabiliza la unión de AP-1 y AP-3 con las membranas<sup>46,53</sup> y que se co-localiza con la clatrina y con AP-1 a nivel del sistema trans-golgi, al igual que MHC-I, lo que sugiere que a este nivel también regula su expresión<sup>46</sup>.

**Nef en asociación con las quinasas celulares.** Se ha demostrado que Nef *in vitro* se asocia por lo menos con una quinasa serina/treonina celular<sup>2</sup>. Nef interactúa además con la quinasa Src Lck de linfocitos T, produciendo daño

específico en la señalización<sup>54</sup>. Nef es capaz de modificar la actividad catalítica de otros miembros de la familia Src, incluyendo Fyn, Hck y Lyn al interactuar con ellas<sup>46,54</sup>.

Se ha descrito la interacción de Nef con otras proteínas celulares. La familia de proteínas PAK juega un papel muy importante en la organización del citoesqueleto y la apoptosis<sup>46</sup>. Nef interactúa con PAK-2, y se cree que participa en el ensamble y liberación de los viriones del VIH-1. Wolf *et al.*<sup>55</sup> muestra que Nef es capaz de activar PAK, que compromete la fosforilación de la quinasa fosfatidil inositol-3 (PI-3). La asociación de Nef/PI-3/PAK fosforila e inactiva la proteína proapoptótica Bad, sin involucrar la proteína quinasa B-Akt-quinasa, lo que le permite inducir la muerte de las células vecinas sanas, pero protege las células infectadas de apoptosis por vía mitocondrial<sup>46</sup>. Nef también interactúa con P53, que termina en una disminución de la vida media de esta proteína proapoptótica, disminuyendo su unión con el ADN<sup>46</sup>. También se ha descrito la unión de Nef con miembros de la familia de quinasas serinatreonina, tales como MAPK y PKC. En efecto, se demostró que Nef es sustrato de PKC<sup>46</sup> y que inactiva a MAPK<sup>56</sup>, pero aún es desconocido el papel o implicaciones de estas interacciones.

**Vif supervisa el ensamble del virus.** La proteína viral Vif, al igual que las proteínas celulares ciclofilina A (CyPA) y la proteína-quinasa activada por mitógenos (MAPK) debe estar presente en la célula infectada donde se está llevando a cabo el ensamblaje de los viriones. La ausencia de estas proteínas resulta en el bloqueo de la infección poco después de la entrada en la célula blanco<sup>4</sup>. Vif es una proteína básica de 23 kDa que se produce en un estado tardío del ciclo de replicación; se ha demostrado que los residuos bási-

cos de su porción carboxiterminal se asocian con la fase citoplásmica de la membrana celular<sup>57</sup>.

Una fracción sustancial de Vif está presente en el sitio de ensamble del virus cerca de la membrana plasmática y se ha sugerido que esto capacita a Vif para modular el ensamble del virión de una manera que facilita el desensamble u otros eventos tempranos de infección<sup>4</sup>.

Estudios recientes sugieren una asociación de Vif con la proteína intermedia de filamento, con la vimentina, con la tirosina quinasa Hck, y con HP68, una proteína celular de unión a ATP<sup>58</sup>; el papel de estas interacciones aún es materia de estudio. Se demostró por microscopía confocal que Vif se encuentra soluble en el citoplasma o se asocia con el citoesqueleto con los filamentos intermedios, vimentina y queratina<sup>57</sup>. La presencia de Vif afecta la estructura de los filamentos intermedios y puede producir colapso completo de la red conformada por ellos, resultando en la formación de agregados perinucleares que contienen tanto Vif como filamentos intermedios.

CEM15/APOBEC36 es una proteína celular requerida para la resistencia a la infección por un VIH-1 deficiente del factor de infectividad Vif. Harris *et al.*<sup>59</sup> muestran que esta proteína es una deaminasa incorporada en el virión durante la producción viral y tiene como función la deaminación de deoxicidina a deoxiuridina en la cadena negativa de un cADN de retrovirus, produciendo la destrucción del virus. Los autores demuestran que Vif es capaz de proteger al MLV de ese efecto.

## CONCLUSIONES

Para cumplir sus funciones las proteínas reguladoras y las accesorias necesitan interactuar con factores de la célula huésped en los diferentes pasos

de la infección viral. Una coordinación mediada por la interacción proteína-proteína es clave para una replicación eficiente y a la vez para controlar la maquinaria celular. Sin embargo, a pesar de los avances logrados en los últimos años en la comprensión de la relación virus-hospedero, es necesario profundizar en el tema con el propósito de utilizar estos conocimientos como una herramienta en la lucha contra la dispersión del virus y/o el desarrollo o progresión de la enfermedad causada por la infección.

En los últimos años, las proteínas virales regulatorias y/o sus ligandos, han comenzado a ser blanco de muchos estudios con fines terapéuticos, porque el ciclo de vida del virus es dependiente de su función. El desarrollo de péptidos o la caracterización de proteínas celulares capaces de inhibir en forma específica sus funciones, será un gran avance en la búsqueda de nuevos medicamentos que permitan luchar contra la progresión del SIDA.

Igualmente, las características de las proteínas virales las convierten en un blanco potencial para estudiar los eventos celulares; un buen ejemplo es la proteína Vpr, que por su capacidad de retardar la entrada en fase G2, puede permitir estudiar eventos relacionados con el ciclo celular.

También es muy interesante el mecanismo utilizado por Nef para regular negativamente la expresión de MHC-I en la membrana citoplasmática de la célula infectada. Mediante esta modulación, el VIH-1 logra escapar de la actividad de los linfocitos T citotóxicos (CTL). Se ha encontrado que el HLA-A, sobre todo el HLA-A2 y el HLA-B son regulados negativamente, mientras que HLA-C y HLA-E no se afectan; esta estrategia le permite a la vez al VIH-1 proteger a la célula infectada de la lisis por células NK. Este es un claro ejemplo de cómo el VIH-1 logra un

equilibrio con el sistema inmune del hospedero para evitar ser eliminado y lograr así mantener la infección.

En resumen, el genoma del VIH-1 presenta toda la información necesaria para obtener un arsenal que pone en "jaque mate" al hospedero, de manera regulada y sin medir las consecuencias.

### SUMMARY

The resistance of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) to antiviral drugs, has prompted a search for alternative therapy methods. This review presents an analysis of the most recent progress in the study of binding among the HIV-1 regulatory/accessory proteins and cell factors, their effects in the cell host and the benefits for the virus. Here, we discuss about how those viral proteins disturb fundamental host cell processes in a very precise way, how the virus uses its proteins to increase the viral replication, to evade the host immune response and to produce disease.

Key words: Human immunodeficiency virus type 1. Proteins. Pathogenesis. AIDS.

### REFERENCIAS

- Bouhamdan M, Benichou S, Rey F, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase ADN repair enzyme. *J Virol* 1996; 70: 697-704.
- Luo T, Foster JL, Garcia JV. Molecular determinants of Nef function. *J Biomed Sci* 1997; 4: 132-138.
- Heguy A. Inhibition of the HIV Rev transactivator: A new target for therapeutic intervention. *Front Biosci* 1997; 2: d283-297.
- Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 1998; 280: 1880-1884.
- Kamp W, Berk MB, Visser CJ, Nottet HS. Mechanisms of HIV-1 to escape from the host immune surveillance. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 740-746.
- Gold MO, Yang X, Hermann CH, Rice AP. PITALRE, the catalytic subunit of TAK, is required for human immunodeficiency virus Tat transactivation *in vivo*. *J Virol* 1998; 72: 4448-4453.
- Ptak RG. HIV-1 regulatory proteins: targets for novel drug development. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11: 1099-1115.
- Bres V, Tagami H, Peloponese JM, *et al.* Differential acetylation of Tat coordinates its interaction with the co-activators cyclin T1 and PCAF. *EMBO J* 2002; 21: 6811-6819
- Chiu YL, Coronel E, Ho CK, Shuman S, Rana TM. HIV-1 Tat protein interacts with mammalian capping enzyme and stimulates capping of TAR RNA. *J Biol Chem* 2001; 276: 12959-12966.
- Chiu YL, Ho CK, Saha N, Schwer B, Shuman S, Rana TM. Tat stimulates cotranscriptional capping of HIV mRNA. *Mol Cell* 2002; 10: 585-597.
- Col E, Gilquin B, Caron C, Khochbin S. Tat-controlled protein acetylation. *J Biol Chem* 2002; 277: 37955-37960.
- Caron C, Col E, Khochbin S. The viral control of cellular acetylation signaling. *Bioessays* 2003; 25: 58-65.
- Zhang M, Li X, Pang X, *et al.* Bcl-2 supregulation by HIV-1 Tat during infection of primary human macrophages in culture. *J Biomed Sci* 2002; 9: 133-139.
- Sawaya BE, Thatikunta P, Denisova L, Brady J, Khalili K, Amini S. Regulation of TNFalpha and TGFbeta-1 gene transcription by HIV-1 Tat in CNS cells. *J Neuroimmunol* 1998; 87: 33-42.
- Abraham S, Sawaya BE, Safak M, Batuman O, Khalili K, Amini S. Regulation of MCP-1 gene transcription by Smads and HIV-1 Tat in human glial cells. *Virology* 2003; 309: 196-202.
- Vodicka MA, Koepp DM, Silver PA, Emerman M. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev* 1998; 12: 175-185.
- Refaeli Y, Levy DN, Weiner DB. The glucocorticoid receptor type II complex is a target of the HIV-1 vpr gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3621-3625.
- Fouchier RA, Meyer BE, Simon JH, *et al.* Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol* 1998; 72: 6004-6013.
- Sherman MP, de Noronha CM, Heusch MI, Greene S, Greene WC. Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 2001; 75: 1522-1532.
- Poon B, Grovit-Ferbas K, Stewart SA, Chen IS. Cell cycle arrest by Vpr in HIV-1 virions and insensitivity to antiretroviral agents. *Science* 1998; 281: 266-269.
- Elder RT, Benko Z, Zhao Y. HIV-1 VPR modulates cell cycle G2/M transition through an alternative cellular mechanism other than



- the classic mitotic checkpoints. *Front Biosci* 2002; 7: d349-357.
22. Mahalingam S, Ayyavoo V, Patel M, *et al.* HIV-1 Vpr interacts with a human 34-kDa mov34 homologue, a cellular factor linked to the G2/M phase transition of the mammalian cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3419-3424.
  23. Ramanathan MP, Curley E, Su M, Chambers JA, Weiner DB. Carboxyl terminus of hVIP/mov34 is critical for HIV-1-Vpr interaction and glucocorticoid-mediated signaling. *J Biol Chem* 2002; 277: 47854-47860.
  24. Sawaya BE, Khalili K, Mercer WE, Denisova L, Amini S. Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription. *J Biol Chem* 1998; 273: 20052-20057.
  25. Fouchier RA, Malim MH. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv Virus Res* 1999; 52: 275-299.
  26. Pongoski J, Asai K, Cochrane A. Positive and negative modulation of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by cis and trans regulators of viral ARN splicing. *J Virol* 2002; 76: 5108-5120.
  27. Fritz CC, Green MR. HIV Rev uses a conserved cellular protein export pathway for the nucleocytoplasmic transport of viral RNAs. *Curr Biol* 1996; 6: 848-854.
  28. Kjems J, Askjaer P. Rev protein and its cellular partners. *Adv Pharmacol* 2000; 48: 251-298.
  29. Venkatesh LK, Gettemeier T, Chinnadurai G. A nuclear Kinesin-like protein interacts with and stimulates the activity of the leucine-rich nuclear export signal of the human immunodeficiency virus type 1 rev protein. *J Virol* 2003; 77: 7236-7243.
  30. Fankhauser C, Izaurrealde E, Adachi Y, Wingfield P, Laemmli UK. Specific complexes of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 2567-2575.
  31. Fineberg K, Fineberg T, Graessmann A, *et al.* Inhibition of nuclear import mediated by the Rev-arginine rich motif by ARN molecules. *Biochemistry* 2003; 42: 2625-2633.
  32. Askjaer P, Jensen TH, Nilsson J, Englmeier L, Kjems J. The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* 1998; 273: 33414-33422.
  33. Schatz O, Oft M, Dascher C, *et al.* Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1607-1612.
  34. Stutz F, Kantor J, Zhang D, McCarthy T, Neville M, Rosbash M. The yeast nucleoporin rip1p contributes to multiple export pathways with no essential role for its FG-repeat region. *Genes Dev* 1997; 11: 2857-2868.
  35. Powell DM, Amaral MC, Wu JY, Maniatis T, Greene WC. HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV ARN splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 973-978.
  36. Chung H, Derse D. Binding sites for Rev and ASF/SF2 map to a 55-nucleotide purine-rich exonic element in equine infectious anemia virus RNA. *J Biol Chem* 2001; 276: 18960-18967.
  37. Martin RA, Nayak DP. Membrane anchorage of gp160 is necessary and sufficient to prevent CD<sub>4</sub> transport to the cell surface. *Virology* 1996; 220: 473-479.
  38. Kerkau T, Bacik I, Bennink JR, *et al.* The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med* 1997; 185: 1295-1305.
  39. Schubert U, Anton LC, Bacik I, *et al.* CD<sub>4</sub> glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol* 1998; 72: 2280-2288.
  40. Margottin F, Bour SP, Durand H, *et al.* A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD<sub>4</sub> to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1998; 1: 565-574.
  41. Coadou G, Evrard-Todeschi N, Gharbi-Benarous J, Benarous R, Girault JP. HIV-1 encoded virus protein U (Vpu) solution structure of the 41-62 hydrophilic region containing the phosphorylated sites Ser52 and Ser56. *Int J Biol Macromol* 2002; 30: 23-40.
  42. Bour S, Perrin C, Akari H, Strebel K. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of I kappa B. *J Biol Chem* 2001; 276: 15920-15928.
  43. Akari H, Bour S, Kao S, Adachi A, Strebel K. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *J Exp Med* 2001; 194: 1299-1311.
  44. Piguet V, Gu F, Foti M, *et al.* Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell* 1999; 97: 63-73.
  45. Arendt CW, Littman DR. HIV: master of the host cell. *Genome Biol* 2001; 2: reviews 1030.1-1030.4.
  46. Greenway AL, Holloway G, McPhee DA, Ellis P, Cornall A, Lidman M. HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. *JBiosci* 2003; 28: 311-321.
  47. Casartelli N, Di Matteo G, Argentini C, *et al.* Structural defects and variations in the HIV-1 nef gene from rapid, slow and non-progressor children. *AIDS* 2003; 17: 1291-1301.
  48. Greenberg ME, Bronson S, Lock M, Neumann M, Pavlakis GN, Skowronski J. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J* 1997; 16: 6964-6976.
  49. Stoddart CA, Geleziunas R, Ferrell S, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Nef-mediated downregulation of CD<sub>4</sub> correlates with Nef enhancement of viral pathogenesis. *J Virol* 2003; 77: 2124-2133.
  50. Iafrate AJ, Bronson S, Skowronski J. Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD<sub>4</sub> expression and CD<sub>4</sub> signaling. *EMBO J* 1997; 16: 673-684.
  51. Williams M, Roeth JF, Kasper MR, Fleis RI, Przybycin CG, Collins KL. Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking. *J Virol* 2002; 76: 12173-12184.
  52. Blagoveshchenskaya AD, Thomas L, Felicangi SF, Hung CH, Thomas G. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell* 2002; 111: 853-866.
  53. Janvier K, Craig H, Hitchin D, *et al.* HIV-1 Nef stabilizes the association of adaptor protein complexes with membranes. *J Biol Chem* 2003; 278: 8725-8732.
  54. Greenway AL, Dutartre H, Allen K, McPhee DA, Olive D, Collette Y. Simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 nef proteins show distinct patterns and mechanisms of Src kinase activation. *J Virol* 1999; 73: 6152-6158.
  55. Wolf D, Witte V, Laffert B, *et al.* HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals. *Nat Med* 2001; 7: 1217-1224.
  56. Greenway A, Azad A, Mills J, McPhee D. Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds directly to Lck and mitogen-activated protein kinase, inhibiting kinase activity. *J Virol* 1996; 70: 6701-6708.
  57. Karczewski MK, Strebel K. Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J Virol* 1999; 70: 494-507.
  58. 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; 26: 143-152.
  59. Harris RS, Bishop KN, Sheehy AM, *et al.* DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 2003; 113: 803-809.