

DESCUBRIENDO AL VIH: CICLO REPLICATIVO

En esta segunda entrega sobre el VIH nos vamos a centrar en el ciclo replicativo del virus, es decir, en aquellos procesos que ocurren desde que penetra en la célula hospedadora hasta que salen las nuevas partículas víricas de la misma. Si no habéis leído aún la parte dedicada al genoma del virus (recomendable) podéis hacerlo [aquí](#).

Antes de empezar tenéis a la derecha una imagen general del ciclo replicativo del VIH. De esta forma os podéis situar más fácilmente sobre las distintas etapas que se describen más adelante.

¿Cómo empieza todo?

El proceso comienza cuando un virión encuentra una célula susceptible de ser infectada, como son los linfocitos T CD4⁺. En este punto se produce el reconocimiento del receptor **CD4** por parte de **gp120**, cuya afinidad es muy alta. La unión de estas moléculas produce cambios conformacionales en la glicoproteína que le permiten interactuar con distintos correceptores pertenecientes a la familia de los receptores para quimiocinas, donde los más importantes son **CCR5** y **CXCR4**. Estos, junto con algunos otros, son los responsables del tropismo celular que presentan las distintas cepas del VIH. La interacción con los correceptores produce más cambios en la espícula (formada por gp120 y gp41), exponiendo un dominio altamente hidrofóbico en el extremo amino-terminal de gp41. Este dominio permite que se fusionen la membrana celular con la vírica facilitando que la cápside penetre en el interior celular.

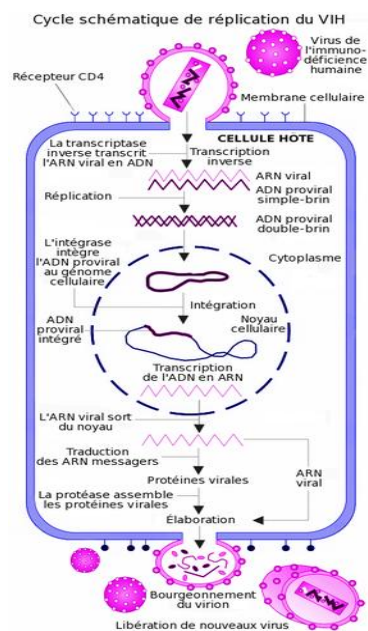
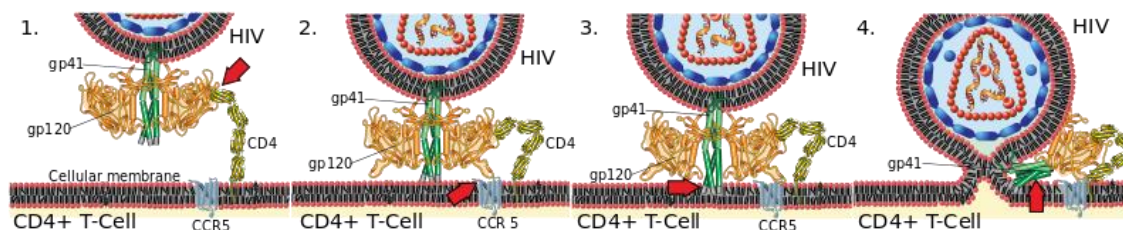


Imagen general del ciclo replicativo del VIH. Vía [wikimedia](#) Licencia [CC](#)



Una vez dentro, y mediante un proceso aún no bien conocido, se produce la modificación de la cápside de forma que se promueve la transcripción inversa del genoma vírico. Este proceso es quizás el más característico de este tipo de virus, por lo que nos vamos a detener un poco más.

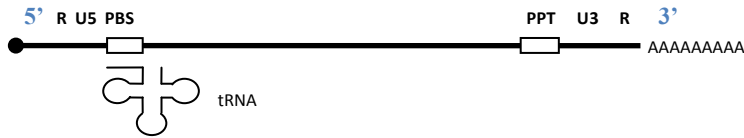
Como ya vimos en la entrada anterior, el genoma consta de **dos copias de RNAmc (+)**. Mediante el proceso de la transcripción inversa o retrotranscripción lo que se consigue es crear una molécula de DNA a partir del RNA, la cual podrá integrarse en el genoma de la célula hospedadora.

La enzima encargada de este proceso de retrotranscripción es la **transcriptasa inversa**, también conocida como retrotranscriptasa, un complejo proteico que consta de dos actividades enzimáticas:

- DNA polimerasa dependiente tanto de RNA como de DNA, lo que le permite copiar las dos cadenas de la molécula de DNA.
- Actividad ribonucleasa (RNasa H) que elimina el RNA en el dúplex DNA/RNA.

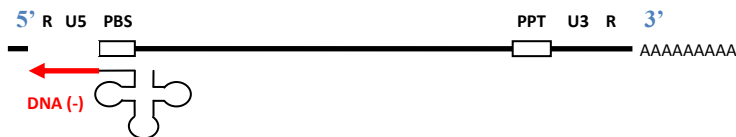
¿Cómo ocurre el proceso de la transcripción inversa?

Al igual que otras DNA polimerasas, la retrotranscriptasa necesita un cebador o *primer* y un molde a partir del cual sintetizar la nueva cadena. El cebador es un tRNA celular (tRNA_{Lys3} en el VIH-1) que se une por su extremo 3' a una secuencia complementaria de 18 nt cerca del extremo 5' del RNA vírico, la región **PBS**.

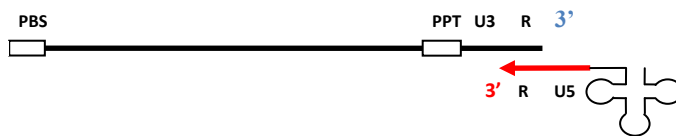


Como molde se utiliza la propia cadena de RNA. De esta forma, a partir de aquí la transcriptasa inversa procederá a sintetizar la doble cadena de DNA, comenzando por la cadena **DNA negativa** (en rojo).

Esta síntesis se inicia desde el tRNA, lo que permite a la retrotranscriptasa copiar el extremo 5' del RNA vírico hasta la región R del mismo. A su vez, la actividad RNasa H va degradando la cadena RNA del dúplex DNA/RNA formado con la síntesis de la nueva cadena.



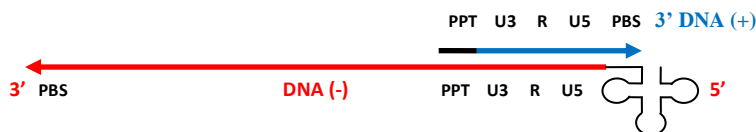
A continuación se produce un "salto" de esta nueva secuencia de DNA hacia el extremo 3' del RNA, de forma que las regiones R DNA/RNA hibridan.



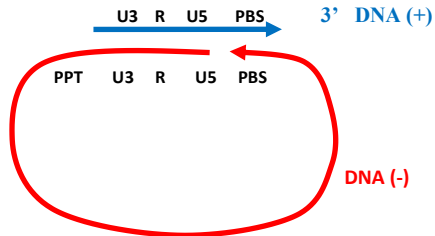
A medida que se continúa sintetizando la cadena DNA (-) la RNasa H va eliminando el RNA excepto en una secuencia rica en purinas (**PPT**), la cual es resistente a la acción de esta enzima.



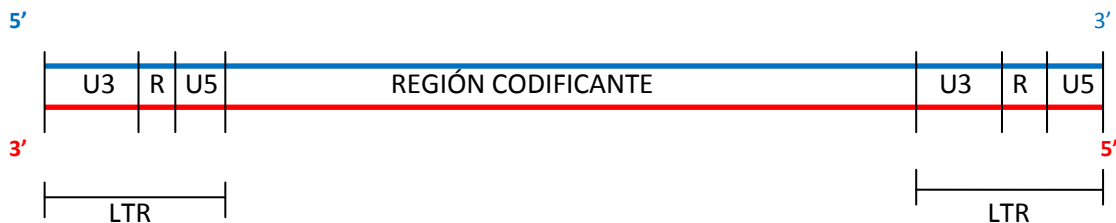
Esta región PPT que ha quedado en el RNA sirve como cebador para la síntesis de la cadena **DNA positiva** (azul). La retrotranscriptasa comienza a añadir nucleótidos en esta cadena hasta que llega al tRNA, donde sólo reconoce los primeros 18 nucleótidos, ya que el siguiente corresponde a una adenina modificada, por lo que se detiene el proceso.



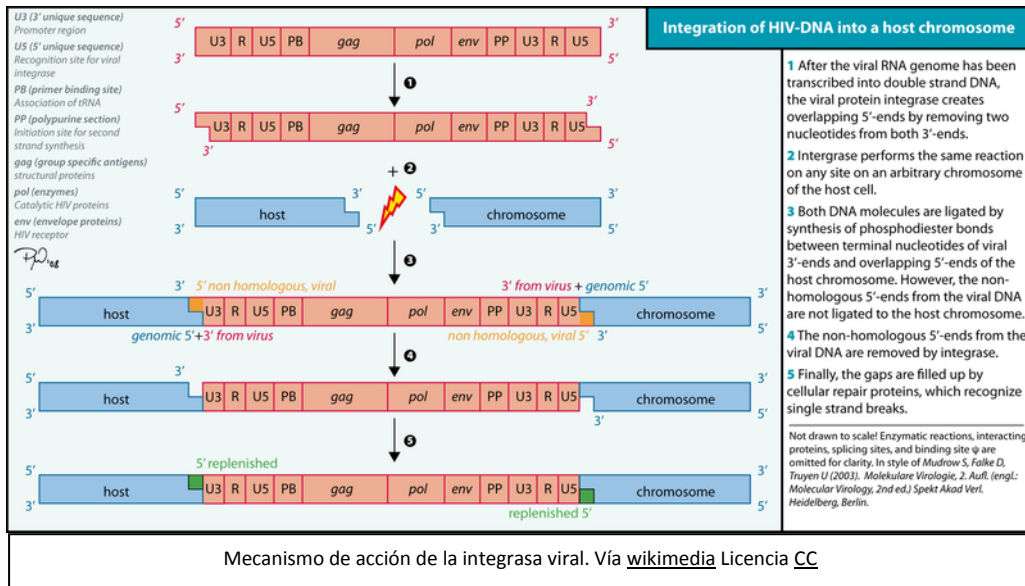
Una vez retrotranscrito el extremo 3' del tRNA, la RNasa H produce un corte en la unión del tRNA con el DNA liberando al primero. Esto prepara el escenario para el segundo "salto" ya que la eliminación del tRNA expone una porción monocatenaria de la cadena DNA (+) cuya secuencia es la misma que la PBS de la cadena DNA (-). Por tanto el extremo 3' del DNA (-) se transfiere al extremo 3' del DNA (+) de forma que hibridan las dos secuencias PBS complementarias.



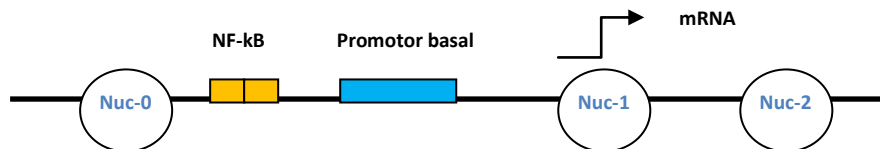
Ahora ambas cadenas de DNA se extienden hasta sintetizar completamente las dos hebras, creando así un DNA con las mismas secuencias en ambos extremos, llamadas **LTR** (*Long Terminal Repeats*), que hacen que la molécula de DNA sea mayor que la de RNA y son importantes para llevar a cabo una correcta transcripción.



Ya tenemos el DNA, por lo que el paso siguiente será integrarlo en el genoma celular. Para ello se acopla a una serie de factores celulares y virales (Vpr) formando el **complejo de preintegración**. Este complejo es transportado al núcleo donde se producirá la integración del DNA en el genoma del hospedador constituyendo la forma proviral del VIH (**provirus**). El proceso necesita de la **integrasa** viral, la cual no integra el DNA proviral en cualquier parte sino que preferentemente lo hace en la región 5' de genes activos o genes que se activan tras la infección. La integrasa tiene 3 funciones implicadas en la integración del DNA vírico. Primero, la actividad exonucleasa produce el corte de dos nucleótidos en cada extremo 3' del DNA viral. Luego, la actividad endonucleasa actúa de la misma forma sobre el DNA celular en el sitio de integración. Por último, la actividad ligasa genera una unión covalente en cada extremo del DNA proviral con lo que ya tenemos el provirus listo para ser transcrito. La integración es un paso decisivo para el mantenimiento de la estabilidad del genoma viral y permite que se pueda llevar a cabo la transcripción génica del mismo.



Independientemente del sitio de integración, el 5' LTR está unido a tres nucleosomas, que denominamos **nuc-0**, **nuc-1** y **nuc-2**. Nuc-1 se localiza inmediatamente downstream (hacia 3') del sitio de inicio de la transcripción y se desorganiza cuando esta se activa. La región entre nuc-0 y 1, aunque tiene longitud suficiente para albergar otro nucleosoma, queda libre ¿por qué? Se ha visto que múltiples factores de transcripción celulares se unen a esta región constantemente, pudiendo afectar al ensamblaje de nucleosomas bien por una competencia directa con las histonas por el sitio, o bien haciéndolo desfavorable para la unión de las mismas. Todos estos factores se unen en esta zona libre de nucleosomas, ya que es donde se encuentran el promotor basal (contiene la caja TATA y tres sitios de unión a SP1) y el potenciador (con dos sitios de unión a NF-κB, un potente activador). Además de esta región, hay algunas más como la región moduladora (contiene un elemento regulador negativo) y secuencias cercanas al sitio de inicio de la transcripción (contienen elementos reguladores como IST y TAR).



Se muestran la región del provirus unida a los nucleosomas (Nuc-0, 1 y 2) así como algunos elementos reguladores descritos en el texto.

La activación eficiente del promotor corre a cargo de la proteína Tat principalmente. En ausencia de esta proteína hay bajos niveles de expresión, que están mediados por factores de transcripción celulares. Una característica única de Tat es la capacidad para interactuar con el RNA en lugar del DNA. Esta interacción se produce específicamente entre Tat y TAR, lo que causa un incremento drástico de los niveles de transcripción al activar a una quinasa (TAK) que hiperfosforila el dominio CTD de la RNA polimerasa II, haciéndola más procesiva.

Por tanto podemos clasificar la transcripción viral en dos fases distintas. La primera está mediada por una interacción directa entre factores de transcripción celulares y elementos que actúan en *cis* localizados en la región promotora. La segunda ocurre inmediatamente después y depende de la acumulación de cantidades suficientes de proteína Tat en la primera fase.

El proceso de la transcripción, por un lado da como resultado los RNA que formarán parte del genoma de las nuevas partículas víricas, y por otro, la generación de aproximadamente 30 transcritos distintos (mRNA), todos ellos derivados de un único transcrito original por splicing alternativo. Esto genera diferentes mRNA que pueden ser divididos en dos clases:

1. mRNA inmaduros o con un splicing parcial. Dependen de la proteína Rev para una expresión eficaz. Codifican para Gag, Gag-Pol, Vif, Vpr, Vpu y Env
2. mRNA pequeños sometidos a splicing completo. Se expresan eficazmente en ausencia de Rev y codifican para Tat, Rev y Nef.

A su vez, la expresión génica también está regulada a un segundo nivel por la exportación nuclear de los transcritos que contienen intrones. Este proceso está mediado por la proteína Rev, ¿cómo? Tanto los mRNA inmaduros como aquellos que han sufrido un splicing parcial tienen una estructura secundaria en un intrón en 3' llamada RRE a la cual se une la proteína Rev. De esta forma permite el paso del núcleo al citoplasma de los mRNA que aún contienen intrones como en los dos casos anteriores, cosa que no sería posible en una situación normal en la que para que se exporte al citoplasma el mRNA ha de producirse un splicing completo. Estas idas y venidas de REV entre el citoplasma y el núcleo así como su interacción con RRE son algo fundamentalmente importante en la regulación de la expresión génica del VIH.

¿De qué forma relacionamos entonces estas proteínas con las distintas fases de la transcripción vírica? Pues podemos decir que la proteína Tat permite la elevada expresión de mRNA en los momentos posteriores a la infección, es decir, en una etapa temprana, mientras que la proteína Rev conduce la última etapa de la transcripción, regulando el balance entre el mRNA pre y post splicing.

Una vez que hemos visto algunos de los aspectos más relevantes relacionados con la transcripción tocaría pasar a la síntesis de las distintas proteínas a partir de estos mRNA. Como estas ya las vimos en *Descubriendo al VIH: el genoma* no nos vamos a detener en ellas y pasaremos directamente al ensamblaje de las nuevas partículas víricas.

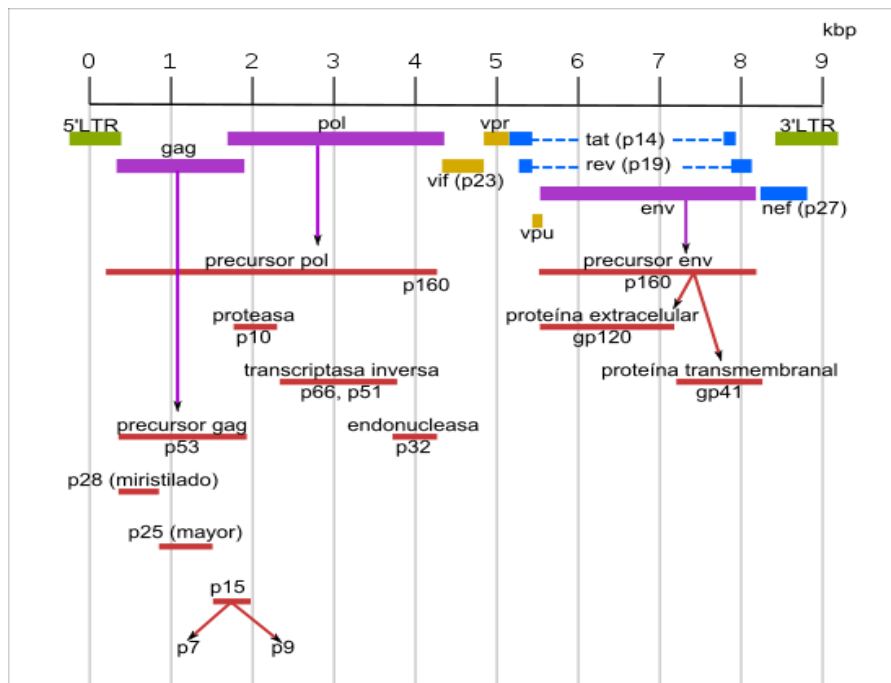
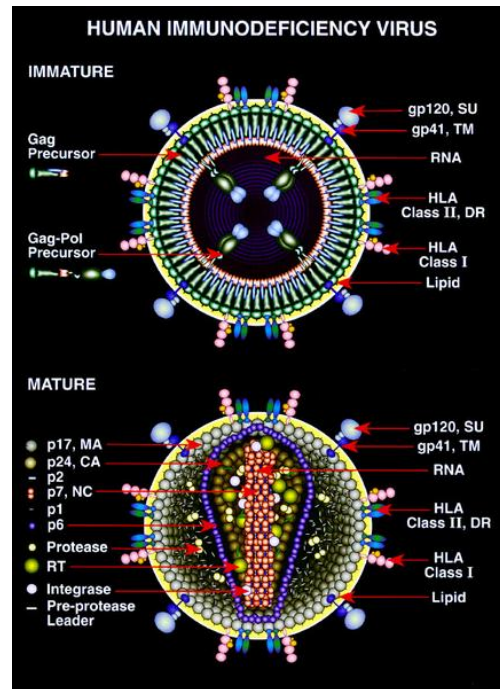


Imagen 5. Se muestra la localización en el genoma de los distintos genes y secuencias que lo componen así como las proteínas a las que dan lugar finalmente. NOTA: algunas proteínas no coinciden con las descritas en el texto, aunque se pueden intuir y/o identificar con el nombre. Vía: [wikimedia](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Genoma_VIH.png). Licencia: [CC](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Durante la última etapa del ciclo replicativo, el VIH tiene que empaquetar las dos copias de su genoma RNA. Si tenemos en cuenta el gran número de distintas moléculas virales de RNA que hay en la célula en ese momento podemos imaginar que este proceso no es tan sencillo como pueda parecer. ¿Qué ocurre entonces para que sólo se empaqueten las dos copias de RNA que corresponden al genoma? Pues parece que el precursor Gag tiene mucho que decir al respecto. Este está compuesto por tres dominios principales (MA, CA y NC), así como otros segmentos funcionales importantes. Lo que parece ocurrir es que el genoma vírico se une directamente al dominio correspondiente a la proteína NC a través de la secuencia ψ localizada en 5'. De esta forma, un pequeño número de moléculas Gag junto con dos copias del genoma se dirigen hacia la membrana plasmática para incorporarse a los sitios de ensamblaje, donde moléculas Gag adicionales (sin genoma) y Gag-Pol se agrupan para formar una partícula vírica inmadura. Una vez aquí, para que las proteínas que componen estos precursores sean funcionales deberán ser cortadas por la proteasa viral, reorganizarse y posteriormente dar lugar a una partícula vírica madura e infectiva.



Estructuras de las partículas víricas madura e inmadura. Vía: [wikimedia](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Virus_Immature_Mature.png)

En el caso de las glicoproteínas de la envuelta su procesamiento es diferente. Se sintetizan formando parte de un precursor Env (gp160) que será escindido por una proteasa, en este caso celular, en dos glicoproteínas (gp120 y gp41) formando las espículas de la superficie del virus. Al ser dos glicoproteínas que se encuentran en la membrana plasmática, el precursor Env será procesado mediante el RER-Golgi y, a través de la vía secretora, se dirigirá hacia la membrana plasmática. Los monómeros de la proteína Env forman trímeros en el RER, lo cual marca su desplazamiento hacia el aparato de Golgi donde será procesada dando lugar a gp120 y gp41. Estas se unirán formando trímeros de cada glicoproteína, dando lugar finalmente a la espícula vírica, que será la que permitirá la entrada del virus a la célula hospedadora como vimos al principio.

De esta forma, una vez que tenemos todos los componentes que componen la partícula vírica sólo falta el ensamblaje de todos ellos en la membrana plasmática y la posterior gemación del virión para dar lugar, mediante procesamiento proteico y reorganización, a partículas víricas maduras e infectivas. Creo que no hace falta decir que aunque aquí se describe la salida de una sola partícula, son miles las que abandonan la célula hospedadora por cada virus que infecta a la misma.

Para finalizar, decir que en esta segunda entrega de “Descubriendo al VIH” hemos seguido los pasos que lleva a cabo el virus desde que reconoce a la célula hospedadora hasta que salen los nuevos viriones, los cuales madurarán y podrán infectar otras células. Nos hemos detenido en algunos de los procesos más característicos de este virus y, aunque me hubiera gustado pararme un poco más en otros por los que hemos pasado ligeramente, he decidido no hacerlo para no alargar (y complicar) más este tema. Creo que de esta forma se puede tener una visión general bastante completa del ciclo replicativo de este virus tan importante y a la vez tan fascinante.

REFERENCIAS

- Bell NM, Lever AML (2013). HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends in Microbiology*. 21 (3): 136-142

- Checkley MA, Luttge BG, Freed EO (2011). HIV-1 Envelope Glycoprotein Biosynthesis, Trafficking, and Incorporation. *J. Mol. Biol* 410: 582-608.
- Delgado R (2011). Características virológicas del VIH. *Enf Infecc Microbio Clin*. 29(1):58-65
- Klasse J (2012). The molecular basis of HIV entry. *Celular Microbiology* 14(8): 1183-1192
- Lee S-K, Potempa M, Swanstrom R (2012). The Choreography of HIV-1 Proteolytic Processing and Virion Assembly. *Journal of biological chemistry* 287(49): 40867-40874.
- Lu K, Heng X, Summers MF (2011). Structural Determinants and Mechanism of HIV-1 Genome Packaging. *J. Mol. Biol* 410: 609-633
- Wu Y (2004). HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology* 1:13