

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



**Papel de la quimiocina CXCL12/SDF-1 en la evolución del  
tropismo viral en la infección por el VIH-1**

Memoria de tesis doctoral presentada por

**Nuria González Fernández**

para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas

Trabajo dirigido por el

**Dr. José Alcamí Pertejo**

Jefe de la Unidad de Inmunopatología del SIDA

Instituto de Salud Carlos III

Madrid, a 25 de octubre de 2007



<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 GENERALIDADES</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Estructura de la partícula viral.....	2
1.1.2 Genoma viral.....	2
1.1.3 Ciclo de replicación del VIH.....	4
<b>1.2 RECEPTORES DEL VIH Y ENTRADA DEL VIRUS EN LA CÉLULA</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 CD4, receptor del VIH.....	4
1.2.2 Receptores de quimiocinas como correceptores del VIH-1.....	5
1.2.3 Quimiocinas y receptores de quimiocinas.....	6
1.2.3.1 Quimiocinas.....	6
1.2.3.2 Receptores de quimiocinas.....	8
1.2.4 Clasificación del VIH en función del correceptor utilizado.....	9
1.2.5 Métodos de estudio del tropismo viral.....	9
1.2.6 Otras moléculas implicadas en la unión del VIH-1 a la membrana celular.....	10
<b>1.3 MECANISMO DE ENTRADA DEL VIH</b> .....	<b>12</b>
1.3.1 Unión y fusión del virión y la célula.....	12
1.3.2 Polimorfismos en los genes de quimiocinas y de sus receptores.....	14
1.3.3 Quimiocinas como inhibidores de la entrada del VIH.....	15
1.3.4 Inhibidores de la entrada viral.....	16
1.3.4.1 Inhibidores de la unión del VIH a la molécula CD4.....	16
1.3.4.2 Inhibidores de los correceptores.....	17
1.3.4.3 Inhibidores de fusión.....	18
<b>1.4 PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA RESPUESTA INMUNE Y EN LA INFECCIÓN POR EL VIH</b> .....	<b>18</b>
1.4.1 Tipos y función de las células dendríticas.....	18
1.4.2 Transmisión del VIH mediada por las células dendríticas.....	20
<b>1.5 EVOLUCIÓN DEL TROPISMO VIRAL IN VIVO</b> .....	<b>21</b>
1.5.1 Selección de cepas R5 durante los estadios iniciales de la infección.....	22
1.5.2 Transición de variantes R5 a X4 en los estadios avanzados de la enfermedad.....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 MATERIAL</b> .....	<b>25</b>
3.1.1 Células.....	25
3.1.1.1 HEK 293T.....	25
3.1.1.2 GHOST.....	25
3.1.1.3 U87.....	25
3.1.1.4 MT-2.....	26
3.1.1.5 Jurkat.....	26
3.1.1.6 PBMC (Células mononucleares de sangre periférica).....	26
3.1.2 Medios de cultivo.....	26
3.1.2.1 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).....	26
3.1.2.2 RPMI.....	26
3.1.3 Cepas bacterianas.....	26

3.1.4	Medios de bacterias.....	27
3.1.4.1	LB ( <i>medio Luria-Bertani</i> ).....	27
3.1.4.2	LB agar.....	27
3.1.5	Anticuerpos.....	27
3.1.6	Citocinas.....	27
3.1.7	Reactivos.....	27
3.1.8	Productos químicos.....	28
3.1.9	Luciferasa.....	28
3.1.10	Enzimas.....	28
3.1.11	Oligonucleótidos.....	28
3.1.12	ARN de interferencia.....	30
3.1.13	Plásmidos.....	30
3.1.14	Mini y maxipreps.....	33
3.1.15	Muestras de pacientes.....	33
<b>3.2</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	34
3.2.2	Obtención de células dendríticas.....	34
3.2.3	Cultivo de líneas celulares.....	35
3.2.4	Citometría de flujo.....	35
3.2.5	Microscopía confocal.....	35
3.2.6	Purificación de ARN viral.....	36
3.2.7	Amplificación del gen <i>env</i> .....	36
3.2.8	Secuenciación.....	37
3.2.9	Mutagénesis dirigida.....	37
3.2.10	Ligación y transformación de las bacterias DH5 $\alpha$ .....	38
3.2.11	Purificación de ADN.....	38
3.2.12	Transfección de HEK 293T.....	38
3.2.13	Detección de la proteína p24 del VIH.....	39
3.2.14	Sistemas de infección.....	39
3.2.15	Transfección de las MDC con los vectores pSUPER-siCXCL12.....	41
3.2.16	Ensayos de migración de células.....	41
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA EL ESTUDIO DEL TROPISMO DEL VIH-1 BASADO EN LA GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES.....</b>	<b>42</b>
4.1.1	Generación de virus luciferasa Renilla con los distintos tropismos conocidos.....	42
4.1.2	Sistemas para la generación de virus recombinantes que portan la envuelta de la población viral del paciente.....	43
4.1.3	Caracterización del tropismo viral en la infección por el VIH-1 con los sistemas desarrollados.....	45
4.1.4	Características del sistema desarrollado.....	47
4.1.4.1	<i>Ciclo múltiple</i> .....	47
4.1.4.2	<i>Sensibilidad para la detección de variantes minoritarias</i> .....	49
<b>4.2</b>	<b>DETERMINACIÓN DEL TROPISMO DE LOS VIRUS CIRCULANTES EN PACIENTES EN EL ESTADIO DE PRIMOINFECCIÓN, INFECTADOS POR LAS TRES VÍAS DE TRANSMISIÓN: SEXUAL, INTRAVENOSA Y VERTICAL.....</b>	<b>50</b>
4.2.1	Determinación del tropismo de los virus de los pacientes primoinfectados.....	50
4.2.1.1	<i>Transmisión sexual</i> .....	50
4.2.1.2	<i>Transmisión parenteral</i> .....	51
4.2.1.3	<i>Transmisión vertical</i> .....	52

4.2.1.4	Análisis de las secuencias del dominio variable V3 de la población viral de los pacientes en el estadio de primoinfección.....	53
4.2.2	Estudio de las cepas que componen la población viral de los virus con tropismo dual, 11476 y 42031.....	56
4.2.2.1	Análisis genético y fenotípico de los clones de la envuelta del virus 11476	56
4.2.2.2	Análisis genético y fenotípico de los clones de la envuelta del virus 42031	58
<b>4.3</b>	<b>PROPAGACIÓN DE VIRUS R5 Y X4 EN LA SINAPSIS VIROLÓGICA ....</b>	<b>61</b>
4.3.1	Expresión de CXCL12 en células dendríticas.....	61
4.3.2	Fenotipo de las células dendríticas.....	62
4.3.3	Descripción del sistema de infección en un modelo de cultivo de linfocitos y células dendríticas autólogas.....	62
4.3.4	Facilitación de la propagación a linfocitos de virus R5 pero no X4 por MDC en la sinapsis virológica.....	63
4.3.5	El tratamiento con tripsina provoca una reducción en la transmisión del VIH-1 a los linfocitos por MDC.....	65
4.3.6	Experimentos de competición entre virus de tropismo R5 y X4.....	66
4.3.7	Facilitación de la propagación a linfocitos de virus R5 y R5X4 de pacientes por MDC en la sinapsis virológica.....	67
4.3.8	Facilitación de la propagación a linfocitos de virus X4 por IDC pero no por MDC en la sinapsis virológica.....	68
4.3.9	El anticuerpo anti-CXCL12, K15C, incrementa la infección por las cepas X4 del VIH-1 en un modelo de cultivo de linfocitos y células dendríticas autólogas.....	69
4.3.10	El ARN de interferencia dirigido contra el gen CXCL12 incrementa la infección por las cepas X4 del VIH-1 en un modelo de cultivo de linfocitos y células dendríticas autólogas.....	71
4.3.11	La proteína CXCL12 presente en los sobrenadantes del sistema de infección <i>in vitro</i> muestra actividad quimiotáctica.....	73
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
<b>5.1</b>	<b>EVALUACIÓN DEL TROPISMO DEL VIH-1 .....</b>	<b>76</b>
<b>5.2</b>	<b>EVOLUCIÓN DEL TROPISMO IN VIVO: ESTADIO DE PRIMOINFECCIÓN .....</b>	<b>80</b>
5.2.1	Transmisión sexual.....	81
5.2.2	Transmisión parenteral.....	82
5.2.3	Transmisión vertical.....	82
5.2.4	Virus con tropismo dual.....	83
<b>5.3</b>	<b>PROPAGACIÓN DE VIRUS R5 Y X4 EN LA SINAPSIS VIROLÓGICA ....</b>	<b>83</b>
5.3.1	Expresión de CXCL12 <i>in vivo</i> .....	83
5.3.2	Facilitación de la propagación a linfocitos de virus R5 y R5X4 en la sinapsis virológica.....	84
5.3.3	Interacción del VIH-1 con DC-SIGN y presentación en <i>trans</i> a los linfocitos	85
5.3.4	Interferencia de la quimiocina CXCL12 producida por las células dendríticas maduras en la propagación de las cepas X4.....	86
5.3.5	Modelo propuesto.....	87
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>91</b>

<b>Figura 1-1. Estructura del VIH-1 .....</b>	<b>2</b>
<b>Figura 1-2. Genoma del VIH-1.....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 1-3. Estructura terciaria de la quimiocina CXCL12 .....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 1-4. Estructura de DC-SIGN .....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 1-5. Descripción del proceso de entrada del VIH.....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 1-6. Transmisión del VIH por las células dendríticas .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3-1. Estructura del plásmido pNL-lacZ/env-Ren.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 3-2. Estructura del plásmido pJRRen.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 3-3. Estructura del plásmido p89.6Ren.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 3-4. Estructura del plásmido pJRLuc.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 4-1. Amplificación de un fragmento de 2700 pb que incluye el gen <i>env</i> completo .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 4-2. Caracterización del tropismo de virus de pacientes con el sistema desarrollado .....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 4-3. Caracterización del tropismo de virus recombinantes con envueltas de distintos subtipos .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 4-4. Los virus recombinantes en <i>env</i> realizan varios ciclos de replicación.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 4-5. Sensibilidad en la detección de variantes minoritarias.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 4-6. Análisis de la utilización de correceptor por las Env de pacientes primoinfectados por vía sexual en experimentos de infección.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 4-7. Análisis de la utilización de correceptor por las Env de pacientes primoinfectados por vía parenteral en experimentos de infección.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 4-8. Análisis de la utilización de correceptor por las Env de pacientes primoinfectados por transmisión vertical en experimentos de infección.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 4-9 Análisis genético y fenotípico de los clones de la envuelta del virus 11476 ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 4-10 Análisis genético y fenotípico de los clones de la envuelta del virus 42031 ..</b>	<b>60</b>
<b>Figura 4-11. Expresión de CXCL12 en células dendríticas.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 4-12. Expresión de CD14, CD83, CD86, DC-SIGN, HLA-DR y HS por citometría de flujo en células dendríticas inmaduras (A) y maduras (B) generadas <i>in vitro</i>.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 4-13. Dibujo explicativo del modelo de infección descrito .....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 4-14. MDC incrementan la infección de los virus R5 pero no la de los X4.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 4-15. El tratamiento con tripsina inhibe la transmisión viral de MDC a linfocitos .....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 4-16. Experimentos de competición entre virus R5 y X4 .....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 4-17. MDC incrementan la infección de virus R5 y R5X4 de pacientes .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 4-18. La transmisión de las cepas X4 desde IDC a linfocitos es mayor que desde MDC .....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 4-19. El bloqueo del efecto de CXCL12, con el anticuerpo K15C, incrementa la infección con cepas X4 del VIH.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 4-20. El bloqueo de CXCL12 aumenta la transferencia de las cepas X4 desde las MDC a los linfocitos autólogos.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 4-21. Análisis de la eficacia de los ARNi en la inhibición de la expresión de CXCL12.....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 4-22. El bloqueo del efecto de CXCL12 con ARNi incrementa la infección con cepas X4 del VIH.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 4-23. Migración de PBMC en respuesta a CXCL12 y a sobrenadantes de los experimentos de infección.....</b>	<b>74</b>

<b>Tabla 1-1. Genes del VIH-1 y funciones de las proteínas que codifican .....</b>	<b>3</b>
<b>Tabla 1-2. Polimorfismos en los genes de quimiocinas y de sus receptores .....</b>	<b>15</b>
<b>Tabla 3-1. Oligonucleótidos diseñados .....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 3-2. Secuencias diana en el ADNc de CXCL12 humano .....</b>	<b>30</b>
<b>Tabla 3-3. Características de los pacientes infectados por transmisión sexual y parenteral .....</b>	<b>33</b>
<b>Tabla 3-4. Características de las muestras de los pacientes infectados por transmisión vertical .....</b>	<b>34</b>
<b>Tabla 4-1. Infección de distintas líneas celulares con los virus de referencia .....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 4-2. Eficiencia de la amplificación del gen <i>env</i> según la carga viral .....</b>	<b>44</b>
<b>Tabla 4-3. Tropismo de los virus recombinantes con envueltas de pacientes .....</b>	<b>46</b>
<b>Tabla 4-4. Tropismo de los virus recombinantes con envueltas de distintos subtipos .....</b>	<b>47</b>
<b>Tabla 4-5. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la región V3 .....</b>	<b>54</b>
<b>Tabla 4-6. Tropismo de los virus de los pacientes primoinfectados .....</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 4-7. Tropismo de los clones de la envuelta de los virus con tropismo dual .....</b>	<b>60</b>

# ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario
<b>ADVP</b>	Adicto a drogas por vía parenteral
<b>ARNi</b>	ARN de interferencia
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CD</b>	Grupo de diferenciación
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>col</b>	Colaboradores
<b>CRD</b>	Dominios de reconocimiento de carbohidratos
<b>CTL</b>	Linfocito T citotóxico
<b>DC</b>	Células dendríticas
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetraacético
<b>Env</b>	Envuelta
<b>GalCer</b>	Galactosilceramida
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano
<b>HS</b>	Heparán sulfato
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>IDC</b>	Células dendríticas inmaduras
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-tio-galactopiranosido
<b>kb</b>	Kilobases
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>LFA</b>	Antígeno asociado a la función linfocitaria
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LTR</b>	Repetición terminal larga
<b>MDC</b>	Células dendríticas maduras
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>ml</b>	Mililitro



<b>mM</b>	Milimolar
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>NSI</b>	No sincitial
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS</b>	Tampón salino-fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>RLU</b>	Unidades relativas de luz
<b>RT</b>	Transcriptasa inversa
<b>RT-PCR</b>	Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SI</b>	Sincitial
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>TARV</b>	Tratamiento antirretroviral
<b>TCR</b>	Receptor de células T
<b>TM</b>	Transmembrana
<b>TRITC</b>	Isotiocianato de tetrametil-rodamina
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VSV</b>	Virus de la estomatitis vesicular
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

# RESUMEN

Este trabajo persigue analizar algunas de las causas implicadas en la evolución del tropismo del VIH. En concreto, se estudia el papel de la producción de la quimiocina CXCL12 por células dendríticas (DC) en la selección de variantes de tipo R5 en los estadios iniciales de la infección y en el mantenimiento de las mismas durante la fase crónica de la enfermedad.

Dadas las insuficiencias de los modelos experimentales existentes, como primer objetivo se ha desarrollado un sistema que permite caracterizar el tropismo del VIH-1. Este sistema, que se basa en la generación de virus recombinantes que portan la envuelta de la población viral del paciente y un marcador luciferasa, permite obtener virus quiméricos capaces de realizar varios ciclos de replicación, lo que confiere al ensayo una mayor sensibilidad en la detección de variantes minoritarias.

Con el sistema desarrollado, y como segundo objetivo, se ha analizado el tropismo de los virus circulantes en el estadio de la primoinfección en pacientes infectados por las tres vías de transmisión: sexual, intravenosa y vertical. Observamos que durante la primoinfección aparecen predominantemente virus de tipo R5 y que los virus con tropismo dual encontrados están compuestos por una población homogénea de tipo R5X4. Estos datos indican que hay un factor de selección negativa de los virus X4 durante la fase aguda en individuos infectados por las tres vías de transmisión.

Por último, se ha estudiado el papel de las DC en la propagación de las cepas R5 y X4 en un sistema de infección *in vitro* de linfocitos cultivados con células dendríticas autólogas. En este modelo se ha observado una facilitación de la infección linfocitaria por virus R5, pero no por los de tropismo X4. Esta inhibición en la propagación de los virus X4 está relacionada con la producción de la quimiocina CXCL12 por DC maduras que compite con el virus en la entrada a través del receptor CXCR4. En apoyo de esta hipótesis, el bloqueo de la quimiocina CXCL12, mediante anticuerpos neutralizantes específicos o ARNs de interferencia, incrementó la infección por las variantes X4.

Estos resultados sugieren que la producción de CXCL12 por DC en los órganos linfoides representa un mecanismo antiviral en la sinapsis virológica, que contribuye a disminuir la propagación de las cepas X4 respecto a los virus con tropismo R5. Por tanto, dicho mecanismo constituiría un factor de selección en la evolución del tropismo viral *in vivo*.

# ABSTRACT

This work focuses on the analysis of several causes of the evolution of HIV tropism. Specifically, it has been studied the role of CXCL12 chemokine production by dendritic cells (DCs) in the selection of the R5 variants during the early stages of the infection and in the persistence of these viruses during the chronic phase of the disease.

The first objective was to develop a method to characterize the HIV-1 tropism, which overcomes the imperfections of the existing experimental models. This system is based on the generation of recombinant viruses that harbour the envelope of the patient viral population and a luciferase marker. These viruses can undergo multiple cycles of replication, which translates in an improved sensitivity for the detection of minority variants.

The second objective was to analyze the tropism of viruses from patients in primary infection infected through the three transmission routes (sexual, parenteral and vertical), using the previous system. It has been observed that, during the early infection, R5 viruses are predominant and that the dual-tropic viruses found are composed of an homogenous R5X4 population. Both results indicate there is a negative selection factor for X4 viruses during the acute infection phase in individuals infected by the three transmission routes.

Finally, the role of DCs in the R5 and X4 strains propagation has been studied in an *in vitro* infection system of lymphocytes cultivated with autologous dendritic cells. In this model, it has been observed an enhancement in lymphocyte infection with R5 viruses but not with X4 viruses. This inhibition in the propagation of X4 viruses is related to the production by mature DCs of the CXCL12 chemokine, which competes with the virus in the entry through the CXCR4 receptor. This hypothesis is supported by the fact that when the CXCL12 chemokine was blocked by specific neutralizing antibodies or interference RNAs, the X4 strains infection increased.

These results suggest that the CXCL12 production by DC in the lymph nodes is an antiviral mechanism in the infectious synapse, which contributes to decrease the X4 variants propagation compared to the R5 viruses. Therefore, this mechanism could be a selection factor in the *in vivo* viral tropism evolution.

# 1 INTRODUCCIÓN

---

## 1.1 GENERALIDADES

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se aisló por primera vez en 1983 en el Instituto Pasteur de París, a partir del ganglio linfático de un paciente que presentaba linfadenopatía generalizada (Barre-Sinoussi y col., 1983). En 1984 se describieron otros aislados procedentes de pacientes con SIDA (Popovic y col., 1984; Levy y col., 1984). Gracias a estudios de secuenciación del genoma viral, se demostró que se trataba de aislados distintos de un mismo retrovirus y en 1986 se agruparon bajo la denominación VIH (Coffin y col., 1986).

El VIH pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae* (Gonda y col., 1985). Se han identificado dos tipos de VIH: el VIH-1 (Barre-Sinoussi y col., 1983), principal causante del SIDA en el mundo, y el VIH-2 (Clavel y col., 1986), localizado fundamentalmente en África occidental y de menor patogenicidad que el primero (De Cock y col., 1993).

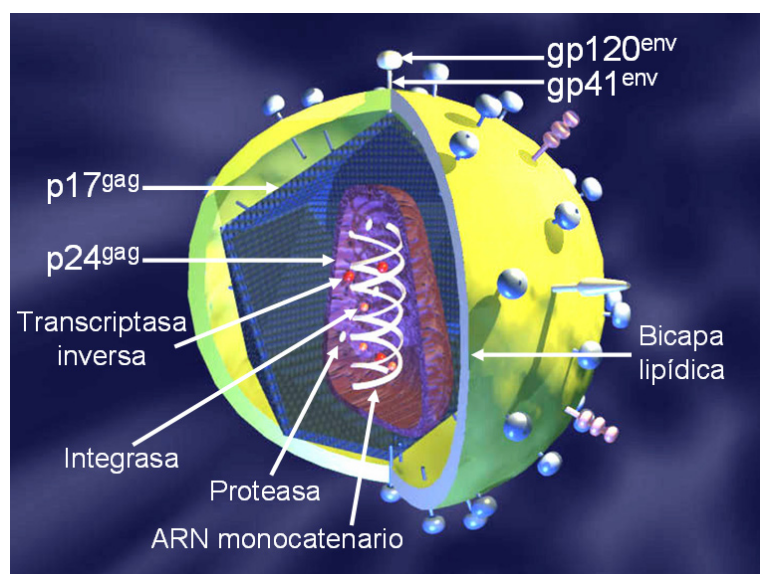
El VIH infecta células del sistema macrofágico como el resto de los lentivirus (Gendelman y col., 1989), pero además tiene la capacidad de infectar linfocitos CD4, lo que origina tanto daños neurológicos como un trastorno profundo de la función inmune (Ho y Kaplan, 1987).

A lo largo de la infección por el VIH se pueden establecer tres períodos. El primero o fase de primoinfección se desarrolla en las primeras semanas tras el contacto con el virus y se caracteriza por altos niveles de viremia y por la ausencia de una respuesta inmune específica, tanto de anticuerpos como de linfocitos T citotóxicos. A continuación, se produce una reducción significativa de la carga viral junto con la aparición de linfocitos T citotóxicos (Koup y col., 1994) y anticuerpos neutralizantes contra el virus (Clark y col., 1991), iniciándose así la fase crónica de la infección. Finalmente, en el estadio avanzado o SIDA desciende el número de linfocitos CD4, se eleva la carga viral y se desarrollan infecciones oportunistas.

Gracias a las investigaciones epidemiológicas, se estableció rápidamente que el VIH podía transmitirse a través del contacto sexual (Pitchenik y col., 1983; Piot y col., 1984), por vía sanguínea (Ragni y col., 1983) y por contagio de la madre infectada a su hijo (Cowan y col., 1984) durante el periodo perinatal (Lapointe y col., 1985; Wofsy y col., 1986) o a través de la lactancia materna (Thiry y col., 1985).

### 1.1.1 Estructura de la partícula viral

Los viriones del VIH (Figura 1-1) son partículas esféricas de 80-100 nm de diámetro. La envoltura viral tiene una estructura de bicapa lipoproteica que incluye componentes lipídicos y proteicos propios de la membrana celular, así como, dos glicoproteínas virales: la glicoproteína de superficie gp120 y la glicoproteína transmembrana gp41. La envuelta recubre la proteína de la matriz (p17) y el “core” o núcleo viral formado por la proteína de la cápside (p24). En el interior de este último, se encuentran dos moléculas idénticas de ARN de cadena sencilla, las proteínas p6 y p7 de la nucleocápside y las enzimas requeridas en las distintas fases del ciclo viral: transcriptasa inversa, integrasa y proteasa.



**Figura 1-1. Estructura del VIH-1**

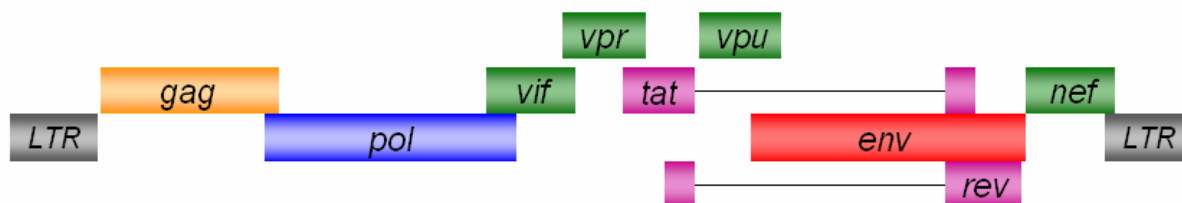
### 1.1.2 Genoma viral

El genoma del VIH está formado por una doble hebra idéntica de ARN de polaridad positiva de 9,8 kilobases de longitud (Sanchez-Pescador y col., 1985). Los genes que codifican las proteínas virales se dividen en genes estructurales y reguladores. Los genes estructurales son: el gen *env* que codifica las glicoproteínas de la envuelta, el gen *gag* que codifica las proteínas de la matriz y del “core” viral y el gen *pol* que codifica las enzimas

responsables de la transcripción inversa, la integración y el procesamiento de los precursores proteicos. Los genes reguladores, que intervienen en la regulación de la expresión génica, son: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* (en el VIH-1) y *vpx* (en el VIH-2). En la Tabla 1-1 se detallan las funciones de las proteínas codificadas por los distintos genes del VIH-1.

**Tabla 1-1. Genes del VIH-1 y funciones de las proteínas que codifican**

	Genes	Proteínas	Funciones
Genes estructurales	<i>env</i>	gp160	Proteína precursora
		gp120	Interacción con los receptores celulares
		gp41	Fusión de membrana celular y viral
	<i>gag</i>	p55	Proteína precursora
		p24	Proteína de la cápside
		p17	Proteína de la matriz
		p7	Proteína de la nucleocápside, facilita la transcripción inversa
		p6	Proteína de la nucleocápside, encapsidación
	<i>pol</i>	Transcriptasa inversa	Retrotranscripción del genoma viral Actividad ARNasa H
		Integrasa	Integración del genoma retrotranscrito
Proteasa		Procesamiento postraduccional de las proteínas precursoras Gag-Pol y Gag	
Genes reguladores	<i>tat</i>	Tat	Transactivador Elongación del ARNm
	<i>rev</i>	Rev	Regulación del transporte del ARNm del núcleo al citoplasma Procesamiento del ARNm
	<i>nef</i>	Nef	Regulación negativa de CD4 y MHC de clase I Aumento de la infectividad asociada con un incremento de la transcripción inversa
	<i>vif</i>	Vif	Incremento de la infectividad viral Induce la degradación de APOBEC, enzima celular con actividad antiviral
	<i>vpr</i>	Vpr	Transporte del complejo de preintegración Transactivador viral
	<i>vpu</i>	Vpu	Detiene el ciclo celular en la fase G2 Aumenta la liberación de viriones Degradación de CD4 en el retículo endoplásmico



**Figura 1-2. Genoma del VIH-1**

En su forma de ADN completamente retrotranscrito (Figura 1-2), estos genes están limitados por unas secuencias repetitivas largas (LTR), que facilitan su integración en el genoma de la célula hospedadora y que contienen elementos reguladores de la transcripción viral.

### **1.1.3 Ciclo de replicación del VIH**

El ciclo biológico del VIH puede dividirse en una etapa temprana y una etapa tardía. La fase temprana comienza con la unión de la partícula viral a la superficie celular, su fusión e internalización. A continuación, se produce la decapsidación y liberación del ARN viral en el citosol. Dicho ARN se retrotranscribe en una doble hebra de ADN, la cual se integra en el genoma de la célula huésped. Después de la integración, el VIH puede permanecer en estado de latencia o replicarse activamente, iniciándose así la fase tardía de su ciclo biológico. En esta etapa, tiene lugar la transcripción del ADN integrado, el transporte al citosol y procesamiento del ARNm y la traducción de las proteínas virales. El ciclo finaliza con el proceso de morfogénesis y la liberación de los nuevos viriones (Wang y col., 2000).

## **1.2 RECEPTORES DEL VIH Y ENTRADA DEL VIRUS EN LA CÉLULA**

### **1.2.1 CD4, receptor del VIH**

La entrada del virus en la célula comienza con la interacción con un receptor viral específico, la molécula CD4. En 1984 se demostró que CD4 era el receptor del VIH ya que anticuerpos monoclonales dirigidos contra esta molécula bloqueaban la infección por el VIH *in vitro* (Klatzmann y col., 1984; Dalglish y col., 1984). Posteriormente, se publicó que formas solubles de CD4 inhibían la infección (Smith y col., 1987; Fisher y col., 1988; Hussey y col., 1988; Trauneker y col., 1988; Deen y col., 1988), así como que CD4 se unía con alta afinidad a la glicoproteína gp120 de la envuelta viral (McDougal y col., 1986).

CD4 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que actúa como ligando del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, MHC II (Janeway y col., 1997). Se expresa predominantemente en linfocitos T cooperadores y su principal función consiste en incrementar la avidéz entre las células T y las células presentadoras de antígeno, formando un complejo ternario con el receptor de células T (TCR) en el reconocimiento de

antígeno. CD4 también se encuentra presente en células de la estirpe mononuclear-fagocítica como monocitos, macrófagos y células dendríticas (Clapham y McKnight, 2002).

### 1.2.2 Receptores de quimiocinas como correceptores del VIH-1

Poco después de la caracterización de CD4 como receptor del VIH-1, se observó que en células murinas transfectadas con CD4 se producía la unión del VIH a esta molécula pero no la entrada del mismo en la célula (Maddon y col., 1986). Estos datos indicaban que estas células carecían de algún factor que permitiera la fusión de su membrana plasmática con la envuelta del virus. Por tanto, se postuló la existencia de otro correceptor o correceptores, a los que se denominó factores de fusión.

En 1996 el grupo de Edward A. Berger identificó una proteína que permitía la fusión y entrada del VIH en células murinas, cuando se expresaba junto con el receptor CD4 (Feng y col., 1996). A esta proteína la denominaron Fusina por estar involucrada en el proceso de fusión entre la membrana celular y viral. Se trataba de un miembro de la familia de los receptores de quimiocinas. Cuando se descubrió que la quimiocina SDF-1/CXCL12 era el ligando natural de la Fusina (Bleul y col., 1996; Oberlin y col., 1996), se propuso el término CXCR4 para este correceptor del VIH, cumpliendo con la nomenclatura de los receptores de quimiocinas. Esta proteína era el principal correceptor para la entrada de las cepas con tropismo por las células T, pero aun faltaba definir cuál era el correceptor para las cepas con tropismo macrofágico.

En 1995 se describió el efecto inhibitorio de sobrenadantes de cultivos de linfocitos CD8 sobre la infección por aislados con tropismo macrofágico (Cocchi y col., 1995). Estos sobrenadantes contenían las quimiocinas CC RANTES, MIP-1 $\alpha$ , y MIP-1 $\beta$ , lo que apuntaba a que los receptores de estas quimiocinas podían actuar como correceptores de los virus M-trópicos. A raíz de este hallazgo, varios grupos se centraron en la búsqueda de este correceptor y en junio de 1996 se demostró que CCR5, el receptor de dichas quimiocinas (Combadiere y col., 1996), es el correceptor de las cepas con tropismo macrofágico (Dragic y col., 1996; Alkhatib y col., 1996; Deng y col., 1996; Choe y col., 1996; Doranz y col., 1996).

Se describieron varios receptores de quimiocinas y algunos receptores huérfanos que podían mediar la entrada de algunas cepas del VIH *in vitro*. Algunos de ellos son: CCR2 (Doranz y col., 1996; Frade y col., 1997), CCR3 (Choe y col., 1996; Doranz y col., 1996), STRL33/Bonzo (Liao y col., 1997), CCR8 (Horuk y col., 1998), APJ (Choe y col., 1998), CCR9 (Choe y col., 1998), GPR1 (Edinger y col., 1998), GPR15/BOB (Edinger y col., 1998)



y CX3CR1 (Combadiere y col., 1998). Sin embargo, los datos epidemiológicos, virológicos y clínicos sugieren que CCR5 y CXCR4 son las moléculas que actúan como correceptores del VIH *in vivo* (Zhang y Moore, 1999).

### 1.2.3 Quimiocinas y receptores de quimiocinas

#### 1.2.3.1 Quimiocinas

Las quimiocinas son proteínas de bajo peso molecular (6-14 KDa) cuya principal función consiste en actuar como mediadores inflamatorios de la migración y activación leucocitaria. Asimismo, están implicadas en otros muchos procesos como respuestas alérgicas, metástasis de tumores, angiogénesis y desarrollo hematopoyético, entre otras funciones (Le y col., 2004; Murakami y col., 2004; Suresh y Wanchu, 2006).

Estas proteínas comparten una estructura consistente en una hélice  $\alpha$  C-terminal, tres láminas  $\beta$  antiparalelas y un bucle N-terminal (Rollins, 1997). En la mayoría de los casos, cuatro residuos de cisteína dentro de la secuencia primaria sirven para unir la proteína por medio de dos puentes disulfuro, proporcionando estabilidad a la estructura terciaria. La mayor parte de las quimiocinas pueden formar dímeros u otros oligómeros (Pease y Williams, 2006). A modo de ejemplo, en la Figura 1-3 se muestra la estructura terciaria de la quimiocina CXCL12.



**Figura 1-3. Estructura terciaria de la quimiocina CXCL12** (tomada de <http://www.rcsb.org/pdb>)

Funcionalmente, las quimiocinas se pueden dividir en quimiocinas inflamatorias o inducibles y homeostáticas o expresadas constitutivamente (Esche y col., 2005). Las quimiocinas inflamatorias dirigen el reclutamiento de los leucocitos hacia los sitios de inflamación, participando en la respuesta inmune innata y adaptativa (Moser y Willimann, 2004). Las quimiocinas inflamatorias típicamente se unen a más de un receptor de quimiocinas. Muchas de estas quimiocinas son procesadas por enzimas proteolíticas presentes en los sitios de infección, que provocan cambios en su función o, incluso, la generación de un antagonista (Rot y von Andrian, 2004). Las quimiocinas homeostáticas son las responsables del tráfico leucocitario basal y de la organogénesis de los tejidos linfáticos (Le y col., 2004). Entre estas quimiocinas es más común la unión a un único receptor específico.

La superfamilia de las quimiocinas se clasifica en base a la disposición de los residuos de cisteínas localizados en el extremo amino terminal. Se distinguen así las familias CXC, CC, C y CX3C, donde la C representa el número de residuos de cisteína en el extremo N-terminal y X denota el número de aminoácidos presentes entre las dos primeras cisteínas (Murphy y col., 2000). Tras una revisión profunda de la nomenclatura de las quimiocinas (Zlotnik y Yoshie, 2000), se denominaron CXCL (CXC ligando), CCL (CC ligando), XCL (C ligando) y CX3CL (CX3C ligando), seguidas de un número identificativo para distinguir entre los diferentes miembros de cada familia.

La familia CXC se subdivide en dos categorías: un grupo de quimiocinas que contienen el motivo aminoacídico ácido glutámico-leucina-arginina (ELR) precediendo al primer residuo de cisteína, y aquellas que carecen de dicho motivo (Ward y Westwick, 1998). Las quimiocinas que poseen el motivo ELR atraen neutrófilos y tienen propiedades angiogénicas (Moore y col., 1998). Las que no contienen la secuencia ELR atraen linfocitos y ejercen efectos angiostáticos, con la excepción de CXCL12 que es angiogénica (Salcedo y col., 1999). La mayoría de los genes de las quimiocinas de esta familia se localizan en el cromosoma 4.

Los componentes de la familia CC se caracterizan por inducir la migración de monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos (Luster, 1998). La mayor parte de las quimiocinas CC tienen 4 cisteínas pero se han descrito algunas quimiocinas dentro de esta familia con 6 residuos de cisteína. Los genes de muchas de estas quimiocinas se encuentran en el cromosoma 17 (Ward y Westwick, 1998).

El grupo de las quimiocinas C se diferencia del resto en que sólo presenta dos cisteínas. Únicamente se conocen dos componentes dentro de esta familia: XCL1 (Kelner y

col., 1994) y XCL2 (Yoshida y col., 1996). Ambas actúan como factores quimiotácticos de linfocitos T y los genes que expresan estas proteínas se localizan en el cromosoma 1.

La única quimiocina CX3C descubierta hasta el momento es la fractalquina o CX3CL1 (Bazan y col., 1997; Pan y col., 1997). Se presenta tanto en forma soluble como anclada en la membrana celular. Ejerce actividad quimiotáctica sobre linfocitos T y monocitos, además de comportarse como una molécula de adhesión (Umehara y col., 2004). El gen que codifica esta proteína se sitúa en el cromosoma 16.

### 1.2.3.2 Receptores de quimiocinas

Las quimiocinas ejercen sus efectos biológicos interaccionando con receptores de la membrana celular acoplados a proteínas G. Estos receptores de siete dominios transmembrana se dividen en receptores CXCR, CCR, XCR y CX3CR en función de la familia de quimiocinas a la que se unen (Murphy y col., 2000). Algunas quimiocinas se unen a un único receptor y viceversa. Sin embargo, también se da redundancia en las interacciones entre las quimiocinas y los receptores, ya que algunas quimiocinas se unen a más de un receptor y muchos receptores reconocen más de una quimiocina. A modo de ejemplo, la quimiocina CCL5/RANTES puede unirse a los receptores CCR1, CCR3 y CCR5, mientras que CCR3 interacciona con CXCL11/eotaxina, CCL24/eotaxina-2, CCL26/eotaxina-3, CCL8/MCP-2, CCL7/MCP-3 y CCL13/MCP-4 (Le y col., 2004).

Los receptores de quimiocinas miden entre 340 y 380 aminoácidos de longitud y poseen un dominio N terminal extracelular ácido importante en la unión con el ligando de quimiocina básico. Esta unión promueve una segunda interacción de menor afinidad, originando los cambios conformacionales necesarios para la activación del receptor y la señalización mediada por las proteínas G heterotriméricas (Gether, 2000; Blanpain y col., 2003). Las proteínas G activadas amplifican y transducen señales dentro de la célula mediante la modulación de la actividad de moléculas efectoras, como adenilil ciclasas, fosfolipasas y canales de iones.

El proceso de internalización del receptor está mediado por la fosforilación del dominio C-terminal seguida del reclutamiento de arrestinas, que impide la señalización a través de las proteínas G y facilita la endocitosis dependiente de clatrina (Neel y col., 2005). Las arrestinas también pueden unirse a MAP quinasas dando lugar a la activación de nuevas vías de señalización (Shenoy y Lefkowitz, 2003; Shenoy y Lefkowitz, 2005).

Los receptores de quimiocinas se expresan en gran variedad de poblaciones de células hematopoyéticas, preferentemente en linfocitos, monocitos y células dendríticas, aunque se ha detectado su expresión en células no hematopoyéticas incluyendo neuronas, astrocitos, células endoteliales y epiteliales (Luster, 1998).

#### **1.2.4 Clasificación del VIH en función del correceptor utilizado**

La caracterización de los correceptores del VIH ha permitido clasificar las distintas cepas del VIH en base al correceptor que utilizan para entrar en la célula. Como resultado, las distintas variantes se dividen en cepas R5, si utilizan exclusivamente el correceptor CCR5; cepas X4, aquellas que se unen al CXCR4 y cepas R5X4, que pueden utilizar ambos correceptores (Berger y col., 1998). Esta clasificación es la de mayor aceptación actualmente y ha dejado obsoletas a las anteriores.

Algunas clasificaciones antiguas son: la basada en el tropismo celular, T-trópicas frente a M-trópicas, (Gartner y col., 1986) y la basada en la formación de sincitios, sincitiales frente a no sincitiales (Tersmette y col., 1988). Estas subdivisiones son incorrectas y se deben a sesgos experimentales pues, en realidad, todos los aislados primarios pueden infectar células T CD4 e inducir la formación de sincitios en células que expresen los correceptores apropiados. Únicamente las variantes X4 eran capaces de producir sincitios porque las líneas celulares utilizadas en estos experimentos carecían de CCR5.

#### **1.2.5 Métodos de estudio del tropismo viral**

Se han desarrollado distintos métodos para el estudio del tropismo viral, que permiten determinar a través de qué correceptores entran en la célula las cepas virales analizadas.

Entre los primeros métodos descritos se encuentra el aislamiento del VIH en cultivos celulares y posterior infección de la línea celular MT-2 (Koot y col., 1992). Estas células de tipo linfoblastoide se infectan con los sobrenadantes generados en cultivos de linfocitos activados de pacientes. Los virus capaces de infectar las células MT-2 son los de tipo X4 y R5X4 debido a que estas células presentan el receptor CXCR4 en su membrana, pero no el CCR5. La infección se detecta por la formación de sincitios.

Otra forma de determinar el tropismo por el correceptor es mediante métodos genotípicos basados en la secuenciación de la región V3 de la envuelta del VIH (Hwang y col., 1991). Los primeros análisis mostraban que la carga de los aminoácidos 11 y 25 del bucle V3 estaba involucrada en la determinación del tropismo (Fouchier y col., 1992).

Posteriormente, se han desarrollado otros algoritmos para la predicción del tropismo del VIH, entre ellos, árboles de decisión (Pillai y col., 2003), máquinas de vectores soporte (Pillai y col., 2003), redes neuronales (Resch y col., 2001) y matrices de posiciones por peso, PWM-PSSM, (Jensen y van 't Wout, 2003). Sin embargo, no todos los determinantes genéticos del uso por el correceptor residen en la región V3. Se han identificado otras regiones de la envuelta que influyen en el tropismo, tanto regiones hipervariables, V1, V2, V4 y V5, (Groenink y col., 1993; Boyd y col., 1993; Smyth y col., 1998) como la región C4 de la envuelta (Carrillo y Ratner, 1996). Asimismo, se ha demostrado que la glicosilación de algunos residuos de la envuelta también puede contribuir al tropismo viral (Pollakis y col., 2001).

Otros métodos de estudio fenotípico se basan en modelos de generación de virus recombinantes. Un ensayo de este tipo es el presentado por Trouplin y colaboradores (Trouplin y col., 2001), el cual se basa en la recombinación homóloga entre el producto de PCR amplificado a partir del plasma del paciente, que comprende la región V1-V3 de la envuelta, y un vector proviral derivado del pNL 4.3 defectivo en dicha región. Los virus recombinantes generados, mediante la transfección de células 293T, se utilizan para infectar líneas celulares que expresan el receptor CD4 junto con el correceptor CCR5 o el CXCR4. Estas células llevan un gen indicador inducible (LTR-LacZ), el cual permite determinar el tropismo viral mediante un ensayo colorimétrico.

Recientemente, se ha descrito otro sistema para el estudio del tropismo viral (Whitcomb y col., 2007) que usa virus recombinantes de ciclo único pseudotipados con envueltas derivadas de muestras de plasma de los pacientes. El tropismo de estos virus se mide evaluando la actividad luciferasa en las células diana que expresan los correceptores.

### **1.2.6 Otras moléculas implicadas en la unión del VIH-1 a la membrana celular**

La lectina de tipo C DC-SIGN (del inglés, *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule grabbing nonintegrin*) se une con alta afinidad a la glicoproteína gp120 de la envuelta del VIH-1 y promueve una infección eficiente en *trans* de células que expresan CD4 y los receptores de quimiocinas (Geijtenbeek y col., 2000b). Además, DC-SIGN facilita la infección en *cis* de las células dendríticas que expresan los receptores de entrada (Burleigh y col., 2006). *In vitro*, tanto las células dendríticas inmaduras como maduras expresan DC-SIGN (Geijtenbeek y col., 2002a) mientras que la expresión de DC-SIGN *in vivo* se localiza en células dendríticas de las mucosas, la dermis, la placenta y los órganos linfoides

(Geijtenbeek y col., 2000b; Geijtenbeek y col., 2000c; Jameson y col., 2002; Kammerer y col., 2003).

Las lectinas de tipo C son proteínas transmembrana que actúan como receptores de adhesión celular y están implicadas en el reconocimiento de estructuras de carbohidratos específicas, que están presentes en antígenos y patógenos (van Kooyk y Geijtenbeek, 2003). DC-SIGN (Figura 1-4), proteína transmembrana de tipo II, contiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) con un sitio Glu-Pro-Asn, que predice la especificidad por residuos de carbohidratos ricos en manosa (Weis y col., 1998; Mitchell y col., 2001). Esta proteína posee dos sitios de unión a calcio, requeridos para la unión del ligando al CRD (Geijtenbeek y col., 2002b). El CRD está separado de la región transmembrana por un dominio consistente en siete repeticiones en tandem completas y una incompleta. Este dominio es esencial para la formación de tetrámeros e influye en la especificidad por los carbohidratos (Mitchell y col., 2001). Por último, DC-SIGN presenta una cola citoplasmática que incluye distintos motivos de internalización.



**Figura 1-4. Estructura de DC-SIGN**

El hecho de que DC-SIGN reconozca diferentes estructuras de carbohidratos le confiere un amplio patrón de reconocimiento de patógenos. Además de interactuar con el VIH-1, el VIH-2 y el virus de la inmunodeficiencia de simio (Pohlmann y col., 2001), también participa en el reconocimiento de otros virus, entre ellos, Ébola (Alvarez y col., 2002), citomegalovirus, CMV (Halary y col., 2002), hepatitis C (Pohlmann y col., 2003), Dengue (Tassaneetrithep y col., 2003) y el virus asociado con el síndrome respiratorio agudo severo, SARS-CoV (Yang y col., 2004). También se unen a esta molécula algunas bacterias como es el caso de *Helicobacter pylori*, ciertas cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis* (van Kooyk y Geijtenbeek, 2003).

Se han descrito otras moléculas que interactúan con el VIH-1. Otro miembro de la familia de las lectinas de tipo C, el receptor de manosa expresado por macrófagos puede capturar y transmitir el VIH-1 *in trans* a las células T (Larkin y col., 1989; Nguyen y Hildreth, 2003). Algunas moléculas de adhesión, como LFA-1, ICAM-1 y proteoglicanos de

tipo heparán sulfato, promueven la adsorción e infectividad del VIH-1 (Mondor y col., 1998; Ugolini y col., 1999). En concreto, la presencia de ICAM-1, expuesto en la superficie del virión, y LFA-1 expresado por las células T incrementa la infectividad viral (Fortin y col., 1997). El proteoglicano sindecano puede unirse a la glicoproteína gp120 a través de sus cadenas de heparán sulfato, y funcionar como un receptor en *trans* para la infección de células T que interactúan con células endoteliales (Bobardt y col., 2003).

## 1.3 MECANISMO DE ENTRADA DEL VIH

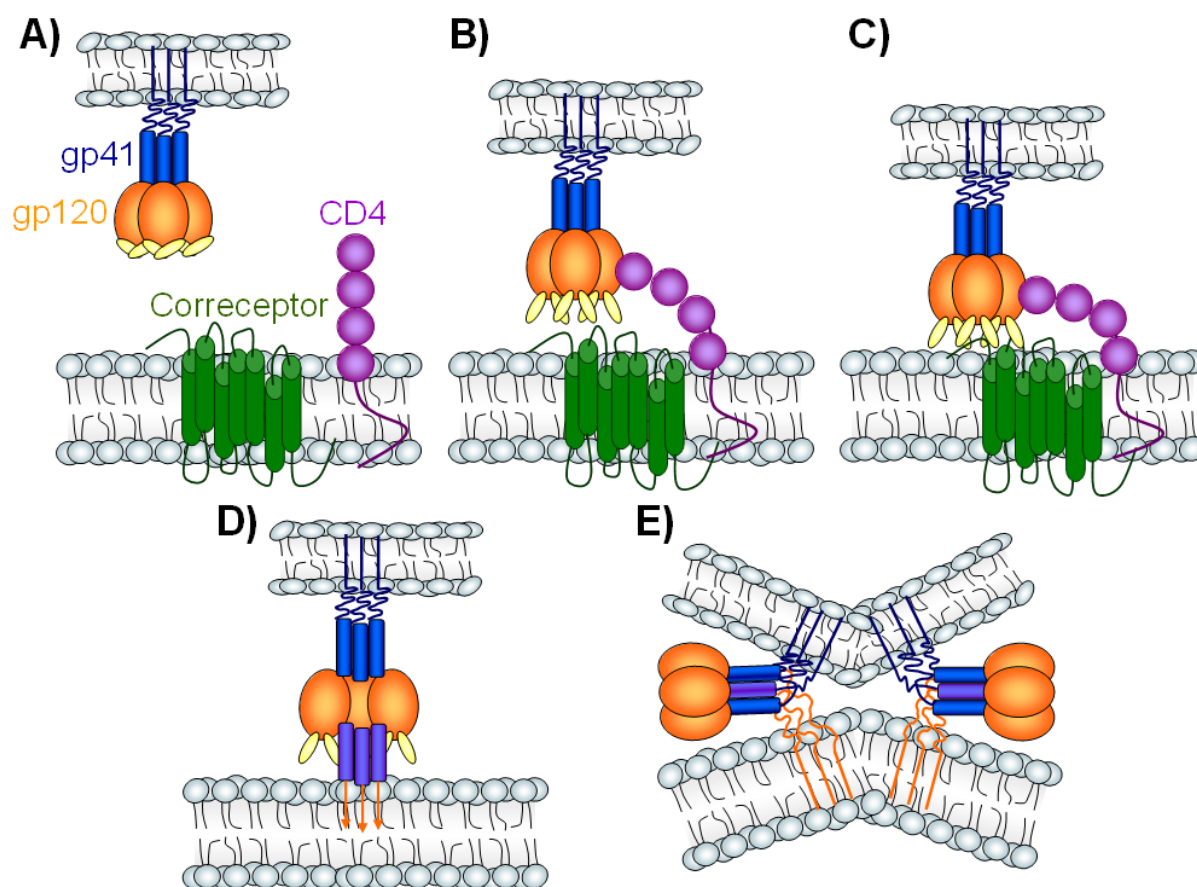
### 1.3.1 Unión y fusión del virión y la célula

La interacción entre la molécula gp120 de la envuelta del VIH y el receptor CD4 causa un cambio conformacional en la glicoproteína, que expone el sitio de unión con el correceptor (Sattentau y Moore, 1991; Thali y col., 1993; Sullivan y col., 1998).

Algunas cepas del VIH-1 (Dumoncaux y col., 1998; Zerhouni y col., 2004) y del VIH-2 (Clapham y col., 1992; Endres y col., 1996; Reeves y Schulz, 1997) son capaces de unirse al correceptor de una manera independiente de CD4. Estos datos han llevado a postular la existencia de un virus ancestral que podía interactuar directamente con los correceptores (Lusso, 2006). Este virus presentaría una mayor sensibilidad a la neutralización mediada por anticuerpos debido a la exposición de la región de unión a los correceptores (Kolchinsky y col., 2001). Por tanto, la estrategia de interacción con el receptor CD4 permite mantener la superficie altamente conservada de unión al correceptor en una conformación críptica, la cual sólo se despliega tras la unión de gp120 a la molécula CD4.

La glicoproteína gp120 contiene 5 regiones variables (V1-V5) intercaladas con cinco regiones conservadas (Starcich y col., 1986). Las regiones variables muestran una estructura en forma de bucle, estabilizada por puentes disulfuro (Leonard y col., 1990). Los mayores determinantes implicados en la especificidad del VIH-1 por su correceptor se han identificado dentro del dominio variable V3 (Choe y col., 1996; Cocchi y col., 1996), el cual interactúa directamente con el correceptor durante el proceso de entrada. Otra zona importante en el reconocimiento del correceptor es una región que, en su conformación unida a CD4, se presenta como cuatro láminas  $\beta$  antiparalelas,  $\beta 2$ - $\beta 3$  de V1/V2 y  $\beta 20$ - $\beta 21$  de la región C4 (Kwong y col., 1998; Rizzuto y col., 1998). Recientemente se ha podido cristografiar la proteína gp120 del virus de la inmunodeficiencia del simio sin estar unida a CD4 (Chen y col., 2005), permitiendo visualizar su conformación nativa antes de la reorganización estructural inducida por la unión a CD4.

El dominio amino terminal (Brelot y col., 1997; Doranz y col., 1997b) y el segundo bucle extracelular (Lu y col., 1997) del correceptor participan en la interacción con gp120.



**Figura 1-5. Descripción del proceso de entrada del VIH.** (A) Dibujo esquemático de la envuelta del VIH y la membrana celular. (B) Interacción de gp120 con CD4 e inducción de cambios conformacionales. (C) Interacción con el correceptor. (D) Liberación del péptido de fusión y anclaje en la membrana celular. (E) Formación de la estructura de haz de seis hélices y fusión de la membrana viral con la celular.

La interacción de la envuelta con el correceptor provoca un reordenamiento en la estructura de gp41. Como consecuencia, esta expone una región altamente hidrofóbica, denominada péptido de fusión, que se ancla a la membrana celular (Gallagher, 1987; Freed y col., 1990). En su estado activado la molécula gp41 se presenta en forma de haz de seis hélices (Chan y col., 1997; Weissenhorn y col., 1997). Dicha estructura es crítica para la fusión de la membrana viral con la celular.



### 1.3.2 Polimorfismos en los genes de quimiocinas y de sus receptores

El conocimiento de que los receptores de quimiocinas actúan como correceptores del VIH ha permitido el descubrimiento de factores genéticos que confieren resistencia a la infección o que interfieren en la progresión de la enfermedad.

En un grupo de sujetos altamente expuestos al VIH y aparentemente resistentes a la infección, se identificó una delección de 32 pares de bases en la región codificante del gen CCR5 (Liu y col., 1996). Esta mutación causa un cambio en la fase de lectura, originando una terminación prematura de la traducción. La proteína resultante es una proteína trunca que no se transporta a la superficie celular (Benkirane y col., 1997). El polimorfismo CCR5  $\Delta$ 32 en homocigosis confiere una alta protección frente a la infección por el VIH, debido a que los individuos que lo presentan carecen de receptor CCR5 funcional. No obstante, se han descrito unos pocos casos de pacientes homocigotos para CCR5  $\Delta$ 32 infectados con virus X4 (Balotta y col., 1997; Theodorou y col., 1997; Biti y col., 1997; Michael y col., 1998) o R5X4 (Gorry y col., 2002; Gray y col., 2006). Estos datos sugieren que CCR5 y CXCR4 representan los receptores mayores del VIH-1 y que el resto de receptores descritos lo son en condiciones *in vitro*, pero tienen menor relevancia para la infección *in vivo*. Los individuos heterocigotos para CCR5  $\Delta$ 32 no son resistentes a la infección (Huang y col., 1996), pero presentan un retraso en la progresión a SIDA (Dean y col., 1996), como consecuencia de unos niveles reducidos en la expresión de CCR5 (Wu y col., 1997).

Se ha identificado otro polimorfismo que otorga resistencia a la infección con virus de tropismo R5 (Quillent y col., 1998). Se trata de una mutación puntual en el nucleótido 303 del gen CCR5, que origina la sustitución de una cisteína por un codón de terminación.

Otros estudios han permitido describir otros polimorfismos en los genes de los receptores de quimiocinas o de sus ligandos, que ejercen efectos en la progresión de la enfermedad. En la Tabla 1-2 se recogen algunos de estos polimorfismos junto con los efectos que causan.

Tabla 1-2. Polimorfismos en los genes de quimiocinas y de sus receptores

	Identificación	Genotipo	Efectos	Referencias
	<b>CCR5: región codificante</b>			
	CCR5 $\Delta$ 32	Delección de 32 p.b.	En homocigosis protege contra la infección En heterocigosis retrasa progresión a SIDA	(Liu y col., 1996; Dean y col., 1996)
	CCR5 m303	Mutación puntual en nucleótido 303	En combinación con un alelo CCR5 $\Delta$ 32 confiere resistencia a virus R5	(Quillent y col., 1998)
Receptores de quimiocinas	<b>CCR5: región del promotor</b>			
	CCR5 59029 G	Polimorfismo A/G en la base 59029 del promotor de CCR5	Progresión más lenta a SIDA	(McDermott y col., 1998)
	CCR5 P1	10 nucleótidos específicos en sitios concretos	Acelera la progresión de la enfermedad	(Martin y col., 1998)
	CCR5 59353 C	Polimorfismo T/C en la base 59353 del promotor de CCR5	Retraso en la progresión a SIDA	(Kostrikis y col., 1998)
	CCR5 59356 T	Polimorfismo C/T en la base 59356 del promotor de CCR5	Incremento de la transmisión perinatal Acelera progresión a SIDA	(Kostrikis y col., 1999)
	CCR5 59402 G	Polimorfismo A/G en la base 59402 del promotor de CCR5	Reduce transmisión perinatal	(Kostrikis y col., 1999)
	<b>Correceptores menores</b>			
	CCR2 64 I	Cambio de valina a isoleucina en la posición 64 del primer dominio transmembrana	Retraso en la progresión a SIDA	(Smith y col., 1997)
	CX3CR1 249I, 280M	Cambio de valina a isoleucina en la posición 249 y de treonina a metionina en la 280	Progresión más rápida a SIDA	(Faure y col., 2000)
Quimiocinas	<b>RANTES: región del promotor</b>			
	RANTES 28 G	Polimorfismo C/G en la base 28 del promotor de RANTES	Retraso en la progresión a SIDA	(Liu y col., 1999)
	RANTES 403 A	Polimorfismo G/A en la base 403 del promotor de RANTES	Retraso en la progresión a SIDA	(McDermott y col., 2000)
	<b>SDF-1/CXCL12: región 3' no codificante</b>			
	SDF-1 3'A	Polimorfismo G/A en la posición 801 de la región 3' no codificante	Acelera/retrasa progresión a SIDA	(Winkler y col., 1998; van Rij y col., 1998)

### 1.3.3 Quimiocinas como inhibidores de la entrada del VIH

Como se ha mencionado previamente, el ligando natural del receptor CXCR4 es la quimiocina SDF1/CXCL12, mientras que CCR5 interacciona, entre otras, con las quimiocinas CC RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ . Estas quimiocinas son capaces de inhibir la infección por el VIH en cultivo (Cocchi y col., 1995; Oberlin y col., 1996), debido a un fenómeno de competición en la unión con sus correceptores y por la internalización de los mismos (Alkhatib y col., 1997; Amara y col., 1997).

La producción de altos niveles de quimiocinas CC se ha asociado con protección frente a la infección (Paxton y col., 1996; Furci y col., 1997), así como con una progresión lenta de la enfermedad o estados asintomáticos en individuos infectados con el VIH (Rosenberg y col., 1997; Garzino-Demo y col., 1999). Por otra parte, las células de los epitelios vaginal, endocervical y rectal producen altos niveles de CXCL12, que interfieren con la propagación de las variantes X4 (Agace y col., 2000). Además, como se ha detallado en el apartado anterior, los polimorfismos en los genes de las quimiocinas pueden alterar la susceptibilidad a la infección o la progresión de la misma. Estas observaciones sugieren que las quimiocinas juegan un papel importante en el control del curso de la infección *in vivo*.

### **1.3.4 Inhibidores de la entrada viral**

A pesar de su indiscutible eficacia, el tratamiento antirretroviral basado en inhibidores de la transcriptasa inversa y de la proteasa presenta varias limitaciones. Este tratamiento reduce la replicación viral pero es incapaz de erradicar el virus. Asimismo, los tratamientos prolongados con estos fármacos provocan la emergencia de variantes resistentes además de varios efectos adversos en el paciente. Por tanto, es importante el desarrollo de otras herramientas terapéuticas. Actualmente se están explorando intensamente los inhibidores de la entrada viral. Una ventaja de estos compuestos frente a los anteriormente mencionados consiste en que son capaces de bloquear el VIH fuera de las células diana. De esta forma, limitarían la capacidad del virus de formar reservorios, contribuyendo a la erradicación del mismo.

Estos inhibidores de la entrada viral se pueden dividir en tres clases diferentes, dependiendo de la fase de la entrada viral sobre la que actúen. La primera clase de compuestos, los inhibidores de la unión, están dirigidos contra la interacción entre gp120 y CD4. En segundo lugar, los antagonistas de los correceptores inhiben la unión del VIH-1 a los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4. La tercera clase son los inhibidores de fusión, que se unen a diferentes componentes de gp41 y, de esta forma, previenen la fusión del virus con la membrana celular.

#### **1.3.4.1 Inhibidores de la unión del VIH a la molécula CD4**

Se han descrito varios compuestos polianiónicos que bloquean la replicación viral al interferir con la adsorción del VIH a la superficie celular. Algunos ejemplos de este tipo de moléculas son: los polisulfatos, los polisulfonatos, los policarboxilatos, los polifosfatos, los polifosfonatos y diversos polioxametalatos. Estas sustancias, cargadas negativamente, ejercen

su actividad antiviral uniéndose al bucle V3, a través de los residuos aminoacídicos de carga positiva.

Otro inhibidor de la adhesión es el compuesto PRO 542 (Allaway y col., 1995), una proteína de fusión que combina la región de unión a gp120 del CD4 humano con una inmunoglobulina IgG2.

#### **1.3.4.2 Inhibidores de los correceptores**

##### **a. Inhibidores de CCR5**

El bloqueo del receptor CCR5 se considera seguro, porque su deficiencia congénita en los homocigotos CCR5-Δ32 no está asociada con ninguna patología. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que frente a la infección causada por el virus del Nilo occidental, la carencia del receptor CCR5 es un mal pronóstico en la defensa contra este virus (Glass y col., 2006), por lo que no puede excluirse que la expresión de CCR5 sea importante frente a determinadas infecciones.

Mediante la adición de grupos hidrofóbicos en la región amino terminal de RANTES se han generado algunos potentes inhibidores de la infección por variantes R5, como: AOP-RANTES (Simmons y col., 1997), NNY-RANTES (Mosier y col., 1999) y PSC-RANTES (Pastore y col., 2003). Estos compuestos inducen la internalización del receptor CCR5 (Mack y col., 1998; Hartley y Offord, 2005). Sin embargo, estos análogos al poseer una fuerte actividad agonista, son desaconsejables para su uso clínico (Lusso, 2006). Otros inhibidores, creados mediante la sustitución de aminoácidos en el extremo amino terminal de RANTES, tienen una actividad agonista reducida: L-RANTES y C1.C5-RANTES (Polo y col., 2000).

Se han desarrollado, además, una serie de moléculas de bajo peso molecular que actúan como antagonistas de CCR5. Entre ellas, se encuentran: TAK-779 (Baba y col., 1999), TAK 220 (Takashima y col., 2005), SCH-C (Strizki y col., 2001), SHC-D o Vicriviroc (Tagat y col., 2004), GW873140 o Aplaviroc (Maeda y col., 2004), CMPD167 (Shen y col., 2004) y UK-427,857 o Maraviroc (Walker y col., 2005). De estos compuestos, sólo tres (Vicriviroc, Aplaviroc y Maraviroc) han alcanzado ensayos en fase III, aunque uno de estos compuestos (Aplaviroc) se ha descartado por toxicidad hepática (Crabb, 2006).

Otro tipo de agentes bloqueantes que inhiben la entrada viral son los anticuerpos dirigidos contra los correceptores. PRO 140 es un anticuerpo monoclonal dirigido contra CCR5, que inhibe la entrada del VIH a concentraciones que no afectan a su actividad como receptor de quimiocinas (Trkola y col., 2001). Otro anticuerpo monoclonal dirigido contra CCR5 es mAb004 (Giguel y col., 2006).

### **b. Inhibidores de CXCR4**

Entre los agentes que bloquean el receptor CXCR4, se incluyen pequeños péptidos como ALX40-4C (Doranz y col., 1997a), T22 (Murakami y col., 1997) y T134 (Arakaki y col., 1999); peptoides como CGP-64222 (Daelemans y col., 2000) y NeoR (Cabrera y col., 2002) y moléculas no peptídicas de bajo peso molecular como KRH-1636 (Ichiyama y col., 2003), AMD3100 (Donzella y col., 1998) y AMD070 (Schols, 2004).

El compuesto AMD3451 (Princen y col., 2004) es un antagonista de CXCR4 y CCR5, el cual es capaz de bloquear la infección *in vitro* por virus R5, X4 y R5X4.

#### **1.3.4.3 Inhibidores de fusión**

El péptido sintético de 36 aminoácidos, T-20 (Wild y col., 1993), inhibe la fusión entre la membrana celular y viral, mediante su unión a la glicoproteína gp41. Un análogo de este es el péptido de 38 aminoácidos T-1249 (De Clercq, 2001), que se corresponde con los residuos 558-595 de la glicoproteína gp160.

## **1.4 PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA RESPUESTA INMUNE Y EN LA INFECCIÓN POR EL VIH**

### **1.4.1 Tipos y función de las células dendríticas**

Las células dendríticas se pueden dividir en dos grandes grupos: células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmocitoides (Grouard y col., 1997; Robinson y col., 1999; Liu, 2001). Entre las primeras se encuentran las células dendríticas intersticiales y las células de Langerhans (Caux y col., 1996). Las células dendríticas mieloides se caracterizan por expresar la molécula CD11 en su membrana y por secretar altos niveles de IL-12, interleucina clave en la inducción de una respuesta inmune de tipo Th1. Estas células están presentes en la mayoría de los tejidos, incluyendo la piel, el hígado, el pulmón, el bazo, los órganos linfoides y la médula ósea (Wilflingseder y col., 2005).

Las células dendríticas plasmocitoides carecen de CD11 pero expresan el receptor de IL-3, CD123, y juegan un papel importante en la inmunidad innata produciendo interferón  $\alpha$  (Siegal y col., 1999). Estas células son menos abundantes que las mieloides y se localizan, esencialmente, en los órganos linfoides.

Las células dendríticas están implicadas en la inmunidad innata, pero además son esenciales en la inducción de la respuesta inmune adaptativa. Las células dendríticas inmaduras, localizadas en la piel y mucosas, capturan patógenos, que procesan en péptidos antigénicos (Banchereau y Steinman, 1998). Como consecuencia de la exposición al

patógeno, las IDC sufren una serie de cambios que conllevan la maduración de estas células, la cual ocurre durante la migración desde los tejidos periféricos a los ganglios linfáticos (Henderson y col., 1997). Las células dendríticas disminuyen su capacidad fagocítica y aumentan su función presentadora. Una vez en el ganglio linfático, las células dendríticas maduras presentan los antígenos, a través del complejo mayor de histocompatibilidad, a las células T vírgenes (Mellman y col., 1998). Las células dendríticas maduras atraen y activan a los linfocitos T mediante la expresión de moléculas coestimuladoras (McLellan y col., 1995; McLellan y col., 1996) y la producción de citocinas (Zhou y Tedder, 1995). Las células dendríticas presentan una alta capacidad de activación de los linfocitos T, ya que un número bajo de células dendríticas y dosis relativamente bajas de antígeno u otro estímulo, son suficientes para iniciar una fuerte respuesta linfocitaria. La eficacia de estas células se puede atribuir a la alta expresión de moléculas de MHC en su superficie (Inaba y col., 1997) y de moléculas accesorias que interactúan con receptores de las células T, incrementando la adhesión (Dustin y col., 1986; Dustin y Springer, 1989). Al conjunto de todas estas moléculas que permiten una interacción eficaz entre las células dendríticas y las células T se denomina sinapsis inmunológica (Grakoui y col., 1999).

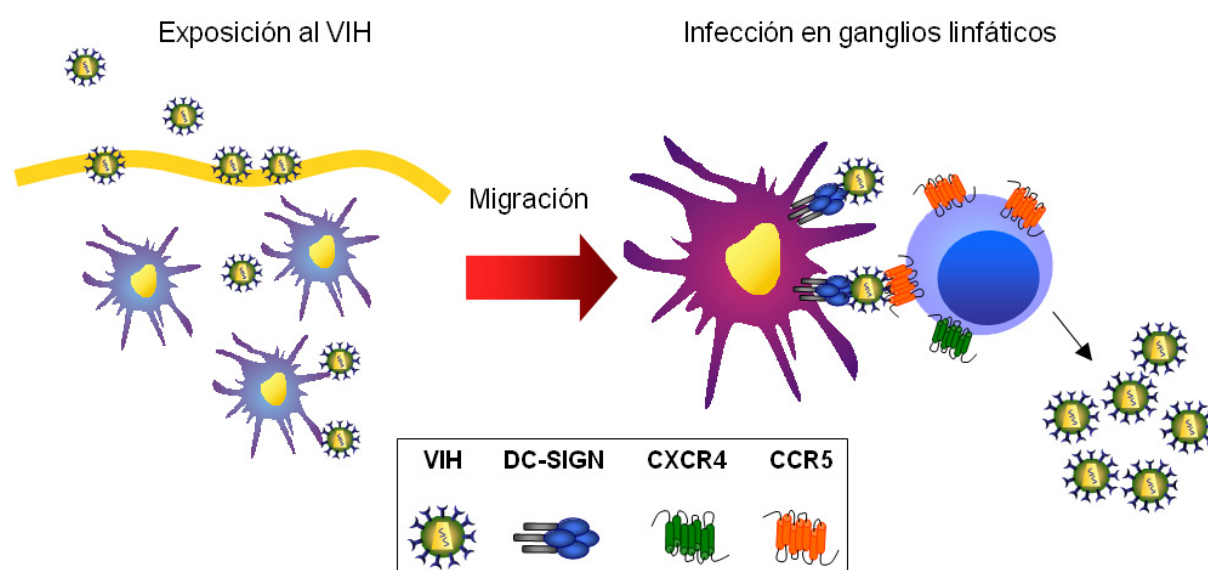
Las células dendríticas inmaduras también intervienen en la inducción de la tolerancia inmunitaria, fagocitando células muertas o cuerpos apoptóticos en los distintos tejidos y presentando estos antígenos propios a las células T de los ganglios linfáticos (Steinman y col., 2000; Geijtenbeek y col., 2004).

Las células dendríticas reconocen los patógenos a través de dos tipos de receptores de reconocimiento de patrones: las lectinas de tipo C (Figdor y col., 2002; Cambi y col., 2005) y los receptores de tipo *Toll* o TLRs, del inglés *Toll-like receptors* (Akira y col., 2001). Las lectinas de tipo C incluyen, entre otros, el receptor de manosa (Sallusto y col., 1995), BDCA-2 (Dzionek y col., 2001), Langerina (Valladeau y col., 1999), DEC-205 (Mahnke y col., 2000) y DC-SIGN (Geijtenbeek y col., 2000c). Tal como se detalla en el apartado 1.2.6, DC-SIGN está involucrada en la captura de distintos patógenos a través de sus dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD), facilitando la endocitosis de los mismos, el procesamiento y la presentación de sus antígenos por parte de la célula dendrítica. Asimismo, DC-SIGN interactúa con las moléculas de adhesión ICAM2 e ICAM3. La unión a ICAM2 media la migración trans-endotelial de los precursores de las células dendríticas desde la sangre a los tejidos (Geijtenbeek y col., 2000a). La interacción entre la lectina DC-SIGN y la molécula ICAM-3 (molécula de adhesión intercelular 3) establece el contacto inicial entre las DC y las células T en reposo, siendo esencial para la activación de estas últimas. La

naturaleza transitoria de esta unión facilita a las DC interactuar con un gran número de células T hasta que se crea una unión más estable con un clon linfocitario, mediante la interacción entre el TCR y el MHC II, cuando este último se encuentra ocupado por un péptido específico (Geijtenbeek y col., 2000c).

### 1.4.2 Transmisión del VIH mediada por las células dendríticas

Las células dendríticas capturan el VIH-1 en los sitios de entrada y lo transportan a los órganos linfoides, donde transmiten eficientemente el virus a las células T CD4 (Cameron y col., 1992; Pope y col., 1994). En los ganglios linfáticos las células dendríticas sirven de reservorios del VIH, contribuyendo continuamente a la infección de nuevos linfocitos reclutados (Pantaleo y col., 1991; Haase y col., 1996). En este contexto, las interacciones entre las células dendríticas y los linfocitos, críticas en la generación de la respuesta inmune, y la presencia de citocinas favorecerían, paradójicamente, la replicación viral (Unutmaz y col., 1999; Piguet y Blauvelt, 2002; Fong y col., 2002).



**Figura 1-6. Transmisión del VIH por las células dendríticas**

Una molécula clave en el proceso descrito de propagación de la infección, es la lectina de tipo C DC-SIGN (Geijtenbeek y col., 2000b). Esta molécula captura el VIH a través de una interacción de alta afinidad con la proteína gp120 y lo transfiere a los linfocitos, incrementando la infección *in trans* de estas células diana (Geijtenbeek y col., 2000b; Arrighi y col., 2004b). En la zona de contacto entre la célula dendrítica y la célula T se concentran los viriones y los receptores del VIH (McDonald y col., 2003). Esta región donde se acumulan los

receptores se denomina sinapsis infecciosa o virológica. La formación de esta sinapsis y la transmisión eficiente del VIH requiere de la expresión de DC-SIGN (Arrighi y col., 2004a) y de la interacción entre LFA-1 e ICAM-1 (McDonald y col., 2003; Groot y col., 2006).

El VIH-1 puede infectar células de Langerhans y otros tipos de células dendríticas *in vivo* (Tschachler y col., 1987; Giannetti y col., 1993; Hu y col., 2000; Choi y col., 2003) e *in vitro* (Patterson y Knight, 1987; Charbonnier y col., 1996; Granelli-Piperno y col., 1998; Patterson y col., 2001). No obstante, la infección de las células dendríticas es muy ineficiente si se compara con la infección de células T CD4 (McIlroy y col., 1995). DC-SIGN podría funcionar como un receptor en *cis*, ya que la expresión de DC-SIGN junto con CD4 y los correceptores incrementa la infección del VIH en distintas líneas celulares (Lee y col., 2001).

Las células dendríticas promueven la replicación del VIH-1 a través de los dos procesos mencionados. Tanto la captura del virus mediante DC-SIGN, como la infección directa de las células dendríticas convergen en la transmisión de los viriones a las células T CD4 (Blauvelt y col., 1997; Turville y col., 2004).

Un tercer mecanismo propuesto (Kwon y col., 2002) postula que la endocitosis del VIH-1 mediada por DC-SIGN a un compartimento no lisosomal de bajo pH, donde el virus puede mantener su infectividad durante varios días, y la posterior exportación a la membrana de viriones resistentes a la degradación, facilitaría la infección en *trans* de los linfocitos CD4. Sin embargo, la validez de este mecanismo ha sido puesta en entredicho por diversos grupos (Moris y col., 2004; Nobile y col., 2005).

## 1.5 EVOLUCIÓN DEL TROPISMO VIRAL *IN VIVO*

La especificidad en la utilización del correceptor muestra un patrón de evolución característico a lo largo de la infección por el VIH (Schuitemaker y col., 1992; Connor y col., 1997). Durante el estadio de la primoinfección y la fase crónica de la infección predominan las variantes que emplean el correceptor CCR5. Estas cepas tienen como principales células diana los linfocitos T CD4 activados y los macrófagos (Wu y col., 1997; Lee y col., 1999). El estadio avanzado de la enfermedad se caracteriza por la emergencia de variantes que utilizan el correceptor CXCR4, un receptor de quimiocinas expresado en un rango más amplio de células, incluyendo linfocitos T en reposo (Bleul y col., 1997; Lee y col., 1999). Este cambio de tropismo, que se detecta en aproximadamente en un 50% de los pacientes seropositivos, está asociado con una caída en el número de linfocitos T CD4 y correlaciona con una mayor rapidez en la evolución a SIDA (Tersmette y col., 1989).



### **1.5.1 Selección de cepas R5 durante los estadios iniciales de la infección**

En la transmisión por vía sexual, las primeras células diana del VIH son las células de Langerhans, situadas en la submucosa, y los linfocitos circundantes, que forman parte del tejido linfoide asociado a mucosas. Ambas células tienen internalizado el receptor CXCR4 (Zaitseva y col., 1997; Agace y col., 2000). Esta regulación negativa de CXCR4 se debe a las altas concentraciones de CXCL12 producidas por las células de los epitelios vaginal, endocervical y rectal (Agace y col., 2000). Además, se ha descrito que las células epiteliales del intestino delgado transfieren virus con tropismo R5 pero no los X4 a las células diana (Meng y col., 2002). La unión del VIH a estas células estaría mediada por la molécula galactosilceramida. Estos fenómenos locales a nivel de los epitelios de las mucosas indican un mecanismo para la transmisión preferente de cepas R5 durante los estadios iniciales de la infección por vía sexual.

Se ha descrito también una producción de CXCL12 por los trofoblastos de la placenta (Hanna y col., 2003), hecho que podría contribuir a la selección de las variantes R5 en la transmisión vertical durante el periodo perinatal.

En nuestro laboratorio se ha observado una intensa expresión de CXCL12 en diversas células del ganglio linfático (Bermejo y col., 2002; Bermejo Herrero, 2003): células epiteliales, células con aspecto de histiocitos de los centros foliculares y células dendríticas de la región parafolicular. En esta tesis, se estudia la influencia de estos fenómenos en la propagación de las cepas con tropismo R5 frente a las X4, con el fin de explicar la selección de cepas con tropismo R5 en los estadios iniciales de la infección por vía endovenosa y la persistencia de las mismas en la fase crónica de la enfermedad.

### **1.5.2 Transición de variantes R5 a X4 en los estadios avanzados de la enfermedad**

El cambio de tropismo R5 a X4 puede estar causado por unas pocas mutaciones en la región V3 (Verrier y col., 1999; Shimizu y col., 1999). Por este motivo, y debido a la expresión más extendida del correceptor CXCR4 *in vivo* (Bleul y col., 1997), se esperaría una mayor emergencia de variantes que emplean el correceptor CXCR4. Sin embargo, la aparición de estas cepas no tiene lugar hasta estadios avanzados de la enfermedad. Sólo pueden aislarse en aproximadamente el 50% de los pacientes y son muy infrecuentes entre los pacientes infectados con virus del subtipo C (Tscherning y col., 1998).

Se ha descrito que las cepas con tropismo R5X4, intermediarias en la evolución de R5 a X4 (Doranz y col., 1996), son, a menudo, muy sensibles a la inhibición con quimiocinas CC

(Kledal y col., 1997). Este hecho dificultaría la emergencia de variantes X4 debido a la dificultad de propagación de las variantes intermedias o de tropismo dual.

Para explicar el cambio de tropismo, se ha propuesto que la interleucina 4 podría estar implicada en la selección de las cepas X4 frente a las R5, ya que esta citocina regula negativamente CCR5 e incrementa la expresión de CXCR4 (Valentin y col., 1998). Individuos que presentan un polimorfismo en el promotor de IL-4, el cual produce un aumento en la expresión de la proteína, son más propensos a albergar virus con tropismo X4 (Nakayama y col., 2000).

La aparición de las variantes X4 se asocia con un peor pronóstico y con un aumento en la tasa de destrucción de linfocitos CD4 (Glushakova y col., 1998). Se ha sugerido que la envuelta de las variantes X4 tiene un mayor potencial citopático que la de las cepas R5 y puede inducir fenómenos de apoptosis al interactuar con la molécula de CXCR4 (Blanco y col., 1999). Otros autores (Grivel y Margolis, 1999) proponen que los aislados R5 son también altamente citopáticos, pero sólo en las células T CD4+/CCR5+ y como estas células constituyen una pequeña fracción de las células T CD4+, su disminución no varía sustancialmente el número total de células T.

En el momento actual aún se desconoce el mecanismo de emergencia de las variantes X4. La comprensión de este fenómeno ayudaría a entender la evolución del tropismo del VIH y facilitaría el diseño de alternativas terapéuticas con el fin de evitar la aparición de estas variantes.

## 2 OBJETIVOS

---

El tema principal de esta tesis es el estudio de la evolución del tropismo del VIH *in vivo*. En concreto, se persigue comprender los mecanismos involucrados en la persistencia de las variantes de tipo R5 durante la fase crónica de la enfermedad y en la selección de dichas variantes durante los estadios iniciales de la infección por vía intravenosa.

Los objetivos concretos de este trabajo son los siguientes:

1. Desarrollar modelos que permitan caracterizar con alta sensibilidad y especificidad el tropismo del VIH-1 en los pacientes infectados.
2. Determinar el tropismo viral de los virus circulantes en pacientes en el estadio de primoinfección, infectados por las tres vías de transmisión: sexual, intravenosa y vertical.
3. Analizar el impacto de la quimiocina CXCL12 en la propagación de virus con tropismo X4 en un modelo de infección *in vitro* en un cultivo de células dendríticas y linfocitos T autólogos.

## 3 MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Células

##### 3.1.1.1 HEK 293T

Las células 293T (American Type Culture Collection, ATCC®, número de catálogo: CRL-11268) son fibroblastos de riñón embrionario humano inmortalizados con adenovirus 5, que poseen el antígeno mayor T del virus del simio SV40 (Pear y col., 1993).

##### 3.1.1.2 GHOST

Esta línea celular deriva de las células HOS (osteosarcoma humano) y está transfectada establemente con el vector retroviral MV7neo-T4, y cotransfectada con el LTR de VIH-2 dirigiendo la construcción hGFP y el promotor CMV IE, que dirige la resistencia a higromicina.

Se utilizaron las células GHOST Parentales (GHOST P), GHOST CCR5 y GHOST CXCR4 (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, número de catálogo: 3679, 3944, 3685). Las segundas expresan de forma estable el receptor CCR5 y las terceras CXCR4. En las células GHOST CCR5 y GHOST CXCR4, los genes de los correceptores se introdujeron por infección retroviral (Morner y col., 1999).

##### 3.1.1.3 U87

Son células humanas de astroglioma, de morfología de tipo epitelial. Están transducidas establemente con el vector retroviral MV7neo-T4 y poseen resistencia a G418. La expresión de CD4 humano se dirige por el vector MV7 bajo el control del LTR del virus de la leucemia murina (MLV).

Se utilizaron las células U87.CD4, U87.CD4.CCR5 y U87.CD4.CXCR4 (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, número de catálogo: 4031, 4035, 4036). Las segundas expresan de forma estable el receptor CCR5 y las terceras CXCR4. En las células

U87.CD4.CCR5 y U87.CD4.CXCR4, la expresión de los correceptores se dirige por el vector BABE bajo el control del LTR del virus de la leucemia murina (MLV) (Bjorndal y col., 1997).

#### **3.1.1.4 MT-2**

Se trata de una línea celular derivada de linfocitos CD4 transformados con el virus de la leucemia de células T de tipo I (HTLV-I) (Harada y col., 1985) (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, número de catálogo: 237).

#### **3.1.1.5 Jurkat**

Es una línea humana procedente de una leucemia de linfocitos T (Schneider y col., 1977) (American Type Culture Collection, ATCC®, número de catálogo: TIB-152™).

#### **3.1.1.6 PBMC (Células mononucleares de sangre periférica)**

Las células mononucleares se aislaron de la sangre de donantes sanos. Los linfocitos activados se obtuvieron a partir de estas células, de la forma descrita en el capítulo de métodos.

### **3.1.2 Medios de cultivo**

#### **3.1.2.1 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)**

Medio completo: DMEM (BioWhitaker) suplementado con L-glutamina a 20 mM (BioWhitaker), con una mezcla de antibióticos que contiene 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (BioWhitaker) y con suero fetal bovino (SFB) (BioWhitaker) al 10%.

#### **3.1.2.2 RPMI**

Medio completo: RPMI-1640 (BioWhitaker) suplementado con L-glutamina a 20 mM, con una mezcla de antibióticos que contiene 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina y con SFB al 10%.

Para el cultivo de células dendríticas se utilizó medio completo sin antibióticos.

### **3.1.3 Cepas bacterianas**

Las células competentes *Escherichia coli* DH5α (Invitrogen), utilizadas en los experimentos de clonaje, contienen el marcador  $\phi 80dlacZ\Delta M15$  que provee  $\alpha$ -

complementación del gen  $\beta$ -galactosidasa de pUC o vectores similares y puede ser usado, por tanto, para la selección de colonias azules o blancas en placas conteniendo X-Gal.

En los experimentos de mutagénesis dirigida se utilizaron las cepas competentes *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene).

### **3.1.4 Medios de bacterias**

#### **3.1.4.1 LB (medio Luria-Bertani)**

#### **3.1.4.2 LB agar**

### **3.1.5 Anticuerpos**

Los anticuerpos monoclonales utilizados en los experimentos de citometría de flujo frente a CD4, CXCR4, CCR5, CD14, CD83, CD86, HLA-DR, DC-SIGN y HS, así como sus controles isotópicos, se obtuvieron de Becton Dickinson.

El anticuerpo monoclonal de ratón K15C (IgG2a  $\kappa$ ) dirigido frente a CXCL12 nos lo cedió el Dr. Arenzana-Seisdedos (Instituto Pasteur, Paris, Francia). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-ratón obtenido en cabra, Alexa488 (Molecular Probes) a una dilución 1:500.

El suero de conejo dirigido contra Gag p17 y p24 del VIH-1 se obtuvo de CFAR (Centre for AIDS Research). Como anticuerpo secundario, se empleó una IgG anti-conejo conjugada con TRITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

### **3.1.6 Citocinas**

La interleucina 4 (IL-4) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) se obtuvieron de R&D Systems y se usaron a una concentración de 20 ng/ml. La IL-2 se obtuvo de Chiron y se utilizó a 300 UI/ml.

### **3.1.7 Reactivos**

El mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (Sigma) se utilizó a una concentración de 5  $\mu$ g/ml.

El lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 055:B5 se obtuvo de Sigma y se utilizó a 100 ng/ml.

El sustrato X-Gal (Sigma) es un  $\beta$ -galactósido degradado por la  $\beta$ -galactosidasa. Uno de los productos de degradación del X-Gal forma un precipitado de color azul sobre las colonias bacterianas con actividad  $\beta$ -galactosidasa. A cada placa de LB agar se añadieron 40  $\mu$ l de una solución de X-Gal a 20 mg/ml.

El isopropil- $\beta$ -D-tio-galactopiranosido (IPTG) (Sigma) es un inductor del gen *lacZ*. A cada placa de LB agar se añadieron 4  $\mu$ l de una solución de IPTG a 200 mg/ml.

### 3.1.8 Productos químicos

- Isopropanol (Merck)
- Cloroquina (Sigma)
- Cloruro cálcico (Merck)
- Hepes (Sigma)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma)

### 3.1.9 Luciferasa

La actividad luciferasa producida por la luciérnaga *Photinus pyralis* o por el organismo marino *Renilla reniformis* se detectaron respectivamente con los reactivos de “Luciferase Assay System” o “Renilla Luciferase Assay System” (ambos de Promega).

### 3.1.10 Enzimas

En la generación de los distintos vectores se emplearon las enzimas de restricción Xba I, Not I y XhoI (GE Healthcare) y la ligasa de DNA T4 (New England Biolabs).

Las polimerasas que se utilizaron son Expand High Fidelity PCR System (Roche) y una mezcla de la transcriptasa inversa “SuperScript”, procedente del virus de la leucemia murina de Moloney, y la ADN polimerasa Taq Platinum (Superscript™ one-step RT-PCR Systems-Invitrogen).

### 3.1.11 Oligonucleótidos

Se detalla una lista (Tabla 3-1) con los oligonucleótidos empleados en las siguientes aplicaciones: amplificación de la envuelta del VIH-1, amplificación de *lacZ* en el vector pUC19, secuenciación de la envuelta del VIH-1 y experimentos de mutagénesis dirigida.

Tabla 3-1. Oligonucleótidos diseñados

Nombre	Secuencia (5'-3')	Posición	
30eu	TATGAAACTTACGGGGATACTTGGG	5697-5721 pNL4-3	Amplificación env
11ed	CTGCCAATCAGGGAAGTAGCCTTGTGT	9135-9161 pNL4-3	
53eu	<u>GCTCTAGAG</u> GCTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGG	6112-6150 pNL4-3	
52ed	TACTTTTT <u>GCGGCCG</u> CGCCACCCATCTTATAGC	8779-8811 pNL4-3	
53eu-A	<u>GCTCTAGAT</u> GTRTGGACTATAGTAGGTATAGAATRTAAGARAKTRC	6112-6157 pNL4-3	
52ed-A	TWCTTTTT <u>GCGGCCG</u> CGCCMCCYATGTTATWGC	8779-8811 pNL4-3	
53eu-C	<u>GCTCTAGAT</u> GTTGGACCATAGYWTATATAGAATATAGGAAATTG	6112-6156 pNL4-3	
52ed-C	TACWTTTT <u>GCGGCCG</u> CGYTCCTCATTTTATWGC	8779-8811 pNL4-3	
53eu-D	<u>GCTCTAGAT</u> GTTGGACYATAGTATWCATAGARTRTARAAG	6112-6152 pNL4-3	
52ed-D	TACTTTTT <u>GCGGCCG</u> CGCCACCCATTTTATAGYAAAGCCC	8772-8811 pNL4-3	
53eu-E	<u>GCTCTAGAAG</u> TGTGGACTATAGTAGYTATAGAATTTAAGAAAATAC	6112-6156 pNL4-3	
52ed-E	TACTTTTT <u>GCGGCCG</u> CGCCTCCCATGTTATAGC	8779-8811 pNL4-3	
Xba-lacZ-U	AG <u>CCTAGAG</u> CGCCCAATACGCAAACCGCCTC	1-23 pUC19	lacZ
Not-lacZ-D	TTTT <u>GCGGCCG</u> CGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGC	425-447 pUC19	
2ed	TGTGGGTACACAGGCATGTGTGGCC	6427-6451 pNL4-3	Secuenciación env
60eu	GCCACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCC	6428-6457 pNL4-3	
5ed	TCTTCTTCTGCTAGACTGCC	7001-7020 pNL4-3	
3ea	GGGAGGGGCATACATTGC	7511-7528 pNL4-3	
50eu	CCTGTGCCTCTTCAGCTACCACC	8500-8522 pNL4-3	
M-Xba-NL-U	GCATTAGTAGTAGCAATAATAATAG <u>CCTAGAG</u> GCTGTGGTCCATAGTAATCATAG	6088-6142 pNL4-3	Mutagénesis dirigida
M-Xba-NL-D	CTATGACTACTATGGACCACAG <u>CCTAGAG</u> GCTATTATTATTGCTACTACTAATGC	6088-6142 pNL4-3	
M-Xba-lacZ-U	GCCTGCAGTCTGACTCTGGAGGATCCCCGGGTACCG	243-278 pUC19	
M-Xba-lacZ-D	CGGTACCCGGGGATCCTCCAGAGTCGACCTGCAGGC	243-278 pUC19	
M-Not-89.6-U	GCTATAAGATGGGAGGC <u>GCGGCCG</u> CAAAACGTAGGGCAGAGGG	8778-8820 p89.6	
M-Not-89.6-D	CCCTCTGCCCTACGTTTT <u>GCGGCCG</u> CGCCTCCCATCTTATAGC	8778-8820 p89.6	
M-Xho-89.6-U	CATTATCGTTTCAGACCCTCCTCCAGCCTACAAGGGACCCGACAGGCCCGAAG	8354-8407 p89.6	
M-Xho-89.6-D	CTTCGGCCTGTCTGGTCCCTTGTAGGCTGGAGGAGGGTCTGAAACGATAATG	8354-8407 p89.6	

Clasificación de los oligonucleótidos según las aplicaciones para las que se utilizaron. Aparecen subrayadas las dianas para las correspondientes enzimas de restricción.



### 3.1.12 ARN de interferencia

Los oligonucleótidos codificando shARN (del inglés, *short hairpin*) dirigido contra el ARN mensajero de CXCL12 se diseñaron siguiendo el método de Elbashir y colaboradores (Elbashir y col., 2002) y se adquirieron en Sigma. Estos oligonucleótidos se hibridaron y ligaron bajo el promotor para la polimerasa H1 del plásmido pSUPER.basic, originando los vectores pSUPER-siCXCL12. En la Tabla 3-2 se muestran las secuencias diana en el ADNc de CXCL12 contra las que están dirigidos los ARNs de interferencia utilizados. Como control, se utilizó un ARNi dirigido contra el ARNm de la proteína GFP.

**Tabla 3-2. Secuencias diana en el ADNc de CXCL12 humano**

ARNi	Posición	Secuencia (5'-3')
siCXCL12 94	94-112	ACGCCAAGGTCGTGGTTCGT
siCXCL12 183	183-201	TGCCGATTCTTCGAAAGCC
siCXCL12 244	244-262	CTCCAAACTGTGCCCTTCA

### 3.1.13 Plásmidos

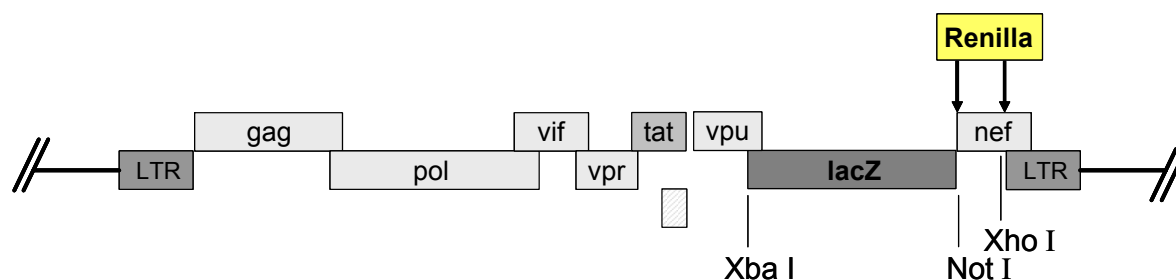
El plásmido **pNL4-3** (Adachi y col., 1986) es un clon recombinante de las cepas NY5 (5') y LAV (3') que contiene el genoma completo del VIH-1 y genera una progenie infecciosa tras su infección en numerosas líneas celulares y también en linfocitos CD4.

El plásmido **pNL4-3.Luc.R-E-** (Connor y col., 1995) es un clon proviral derivado del plásmido anterior que contiene el gen de la luciferasa de luciérnaga insertado en el lugar del gen *nef*. Posee dos cambios en el marco de lectura, de tal forma que no expresa los genes *env* y *vpr*. Por tanto, este plásmido requiere cotransfectarse con un vector de expresión de *env* para generar virus infecciosos.

El vector **pNL4-3Ren** (García-Pérez y col., 2007) se generó sustituyendo el gen *nef* del plásmido pNL4-3 por el gen de la luciferasa Renilla en las posiciones Not I (8797, introducida por mutagénesis dirigida) y Xho I (8887).

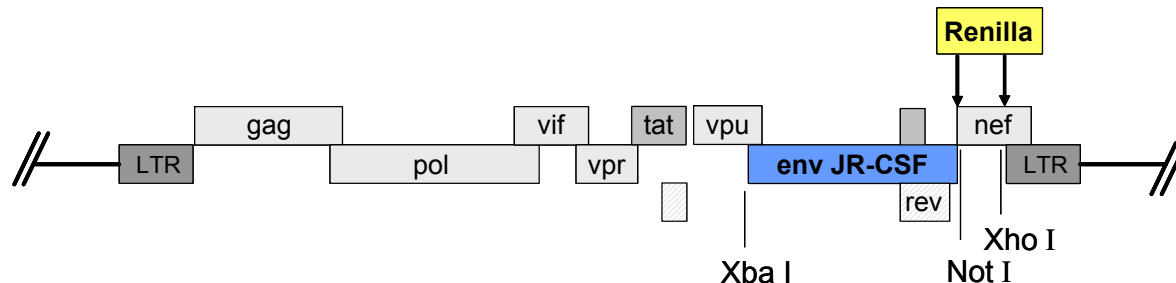
El plásmido **pNL-lacZ/env-Ren** (Figura 3-1) se construyó introduciendo por mutagénesis dirigida el sitio de restricción Xba I en la posición 6114 del plásmido pNL4-3-Ren, seguido de posterior delección de la envuelta mediante corte con los enzimas de restricción Xba I (6114) y Not I (8797) y clonaje en su lugar del fragmento amino terminal de 0,5 kb del gen *lacZ*. El gen *lacZ* se amplificó a partir del plásmido pUC19 con los oligonucleótidos Xba-lacZ-U y Not-lacZ-D que contienen los sitios Xba I y Not I,

respectivamente. Se eliminó el sitio Xba I presente en el gen *lacZ* (posición 257 del pUC19) mediante mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos M-Xba-lacZ-U y M-Xba-lacZ-D. Este sistema nos permite extraer el gen *lacZ*, para sustituirlo por la envuelta completa, de diferentes cepas del VIH o de aislados procedentes de los pacientes a valorar, evitando la interferencia debida al arrastre de poblaciones del virus de referencia.



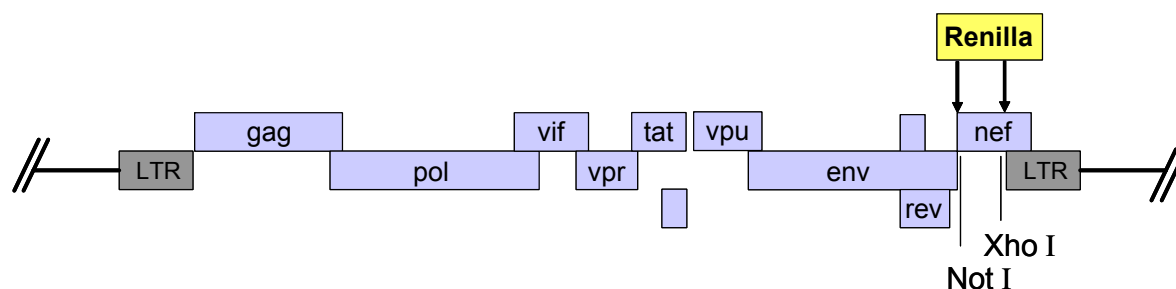
**Figura 3-1. Estructura del plásmido pNL-lacZ/env-Ren**

Se amplificó mediante PCR la envuelta del vector pYK-JRCSF (Koyanagi y col., 1987), con tropismo R5, y se clonó en el vector pNL-lacZ/env-Ren tras ser digerida con las enzimas de restricción Xba I y Not I dando lugar al plásmido **pJRRen**, detallado en la Figura 3-2.



**Figura 3-2. Estructura del plásmido pJRRen**

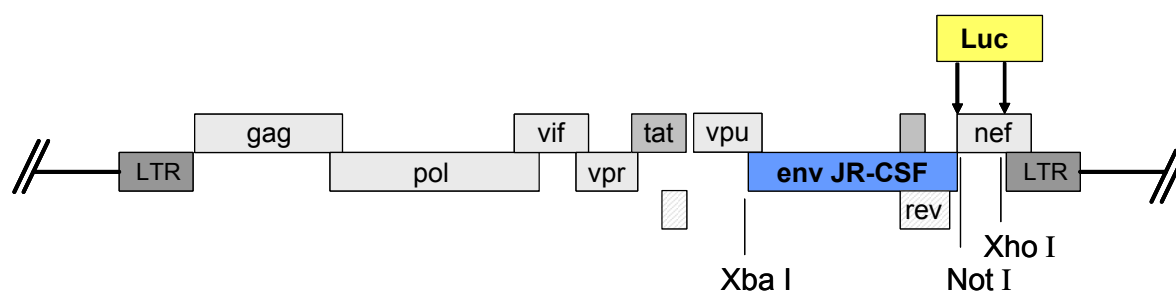
El vector **p89.6Ren** (Figura 3-3), portador de una envuelta de tropismo R5X4, se generó insertando el gen de la luciferasa Renilla en los sitios Not I (8796) y Xho I (8895) del plásmido p89.6. El vector p89.6 es un clon molecular infeccioso de un aislado primario con tropismo R5X4, denominado 89.6 (Collman y col., 1992). El sitio Not I (8796) se introdujo en el plásmido p89.6 mediante mutagénesis dirigida, utilizando los oligonucleótidos M-Not-89.6-U y M-Not-89.6-D, y se eliminó una diana para la enzima Xho I en la posición 8382 con los oligonucleótidos M-Xho-89.6-U y M-Xho-89.6-D.



**Figura 3-3. Estructura del plásmido p89.6Ren**

El vector **pNL4-3Luc** se construyó introduciendo el gen de la luciferasa proveniente del plásmido pNL4-3.Luc.R-E- en el vector pNL4-3 vía NotI (8797) y XhoI (8887), insertándose en el lugar del gen *nef* del VIH-1.

El plásmido **pJRLuc** (Figura 3-4) se generó sustituyendo el gen de la luciferasa Renilla del vector pJRRen por el gen luciferasa proveniente del plásmido pNL4-3.Luc.R-E- en los sitios NotI (8797) y XhoI (8887).



**Figura 3-4. Estructura del plásmido pJRLuc**

El vector **pNL4-3.Ren.R-E-** (Garcia-Perez y col., 2007) se generó clonando el gen de la luciferasa Renilla en el plásmido pNL4-3.Luc.R-E-.

El plásmido **pcDNA-VSV** contiene el ADNc que codifica la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Este plásmido nos lo cedió el Dr. Arenzana-Seisdedos (Instituto Pasteur, Paris, Francia).

El plásmido **pSUPER.basic** (OligoEngine) es un vector de expresión que dirige la síntesis de transcritos de ARN de interferencia bajo el promotor para la polimerasa H1 de la ARN polimerasa III (Brummelkamp y col., 2002).

El plásmido **pmaxGFP<sup>TM</sup>** (Amaxa) codifica la proteína fluorescente verde (GFP) del copépodo *Pontellina plumata*.

### 3.1.14 Mini y maxipreps

Purificación de ADN con “Wizard® Plus SV Minipreps” (Promega) y “Qiagen Plasmid Maxi y Midi Kit” (Izasa).

### 3.1.15 Muestras de pacientes

Las muestras de pacientes en estadio de infección precoz infectados por vía sexual e intravenosa (Tabla 3-3) fueron cedidas por el Hospital Clinic de Barcelona (Dr. Miró, Dr. Pumarola). La primoinfección se definió como la detección de viremia en ausencia de anticuerpos detectados por ELISA. Posteriormente, se confirmó la seroconversión mediante ELISA y Western blot. Las muestras se obtuvieron antes de que los pacientes fueran tratados con terapia antirretroviral (TARV).

Las muestras de pacientes infectados por transmisión vertical (Tabla 3-4) fueron cedidas por el Hospital Gregorio Marañón de Madrid (Dra. Muñoz Fernández).

Las muestras utilizadas para la caracterización del tropismo viral con los sistemas desarrollados (apartado 4.1.3) fueron cedidas por el Dr. Leal del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

**Tabla 3-3. Características de los pacientes infectados por transmisión sexual y parenteral**

Número de muestra	Vía de transmisión	Carga viral: log <sub>10</sub> (copias)/ml	Fecha de:		
			Muestra	Primoinfección	Inicio TARV
7191	SX	4,3	14/07/1998	01/04/1998	NO
8439	SX	4,3	08/10/1998	01/09/1998	25/10/1998
10573	SX	5,4	19/02/1999	07/01/1999	22/02/1999
11525	SX	4,4	16/04/1999	01/09/1998	31/05/1999
14382	SX	3,8	16/09/1999	01/06/1999	22/09/1999
16218	SX	>6	17/12/1999	26/11/1999	03/01/2000
22652	SX	5,1	10/11/2000	01/05/2000	18/04/2001
37343	SX	4,3	10/09/2002	01/03/2002	NO
39775	SX	4,5	19/12/2002	01/03/2002	NO
42031	SX	5,3	19/03/2003	01/12/2002	NO
PBC	SX	5,2	10/07/2002	01/04/2002	NO
11476	ADVP	5,2	14/04/1999	01/01/1999	26/04/1999
15214	ADVP	>6	22/10/1999	01/10/1999	02/03/2000
16114	ADVP	>6	14/12/1999	04/11/1999	17/12/1999
26157	ADVP	>6	20/03/2001	01/02/2001	29/03/2001
38293	ADVP	>6	18/10/2002	01/10/2002	NO
41570	ADVP	3,4	28/02/2003	01/10/2002	NO
80013	ADVP	>6	18/07/1997	15/04/1997	28/07/1997

SX, transmisión sexual; ADVP, adicto a drogas por vía parenteral.

TARV, tratamiento antirretroviral.

**Tabla 3-4. Características de las muestras de los pacientes infectados por transmisión vertical**

Número de muestra	Vía de transmisión	Carga viral: log <sub>10</sub> (copias)/ml	Periodo tras el nacimiento
560	TV	4,3	1,5 meses
1100	TV	6,0	3 meses
1295	TV	4,1	2 meses
1652	TV	5,3	5 meses
1892	TV	6,3	6 meses
1908	TV	6,0	6 meses
4276	TV	5,5	2 meses
4880	TV	5,9	2 meses

TV, transmisión vertical.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Las PBMC se aislaron a partir de sangre de donantes sanos mediante centrifugación a 800 g durante 30 minutos a 22°C en un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (BioWhittaker). A continuación, se recogió la fase que contenía las células mononucleares y se lavó tres veces mediante centrifugación a 480 g durante 10 minutos a 22°C. Por último, las células se trataron con una solución tampón de lisis para eritrocitos (RLB, Sigma), se lavaron y se cultivaron a 37°C en medio RPMI completo a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml.

Los linfocitos activados se obtuvieron a partir de las PBMC incubándolos durante 48 horas en presencia de PHA (5 µg/ml) e IL-2 (300 UI/ml). Los linfocitos que se utilizaron en el modelo de infección *in vitro* de linfocitos y DC autólogas, se cultivaron durante 5 días más en presencia de IL-2 (300 UI/ml) renovando el medio con IL-2 cada 2 ó 3 días.

### 3.2.2 Obtención de células dendríticas

Las PBMC se lavaron tres veces en PBS, se resuspendieron en medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% y L-glutamina a 20 mM y se repartieron en placas de 6 pocillos alrededor de  $3 \times 10^7$  PBMC por pocillo, con el fin de dispensar en torno a  $3 \times 10^6$  monocitos por pocillo. Se incubaron durante una hora a 37°C para que se adhirieran los monocitos a la placa. Seguidamente, se realizaron entre 6 y 7 lavados para eliminar los linfocitos y las plaquetas. Se recogieron estos sobrenadantes que contienen linfocitos, y se

cultivaron como se detalla en el apartado anterior. Para generar las IDC a partir de los monocitos, se añadieron IL-4 (20 ng/ml) y GM-CSF (20 ng/ml). Cuando se requirió diferenciar las células dendríticas inmaduras a maduras, se añadió el quinto día LPS (100 ng/ml). A día 7, se confirmó el fenotipo de las DC analizándolas por citometría de flujo.

### 3.2.3 Cultivo de líneas celulares

La línea celular HEK 293T presenta adherencia al plástico. Para su crecimiento se emplea medio DMEM completo, siendo las condiciones de cultivo fijadas a 37°C en atmósfera saturada de humedad con 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

La línea celular GHOST se cultiva en DMEM completo, suplementado con 500 µg/ml de G418, 100 µg/ml de higromicina y 1 µg/ml de puromicina si expresa los genes de los correceptores.

La línea celular U87 se cultiva en DMEM completo, suplementado con 300 µg/ml de G418 y 1 µg/ml de puromicina si expresa los genes de los correceptores.

Las líneas MT-2 y Jurkat se cultivan en medio RPMI-1640 completo a 37°C en atmósfera saturada de humedad con 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.4 Citometría de flujo

El inmunofenotipaje se realizó con un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). La tinción de fondo se determinó con un anticuerpo monoclonal de igual isotipo y marcado con el mismo fluorocromo que el anticuerpo utilizado en el ensayo. Las células se analizaron utilizando una representación de tamaño frente a complejidad celular.

### 3.2.5 Microscopía confocal

Las células se dejaron adherir durante 30 minutos a 37°C en portas poly-prep (Sigma) y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% y albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS durante 15 minutos a 4°C. A continuación, las células se permeabilizaron incubándolas a temperatura ambiente durante 20 minutos con Triton X-100 al 0,1% en PBS con BSA al 1%, suplementado con SFB al 5%. Tras tres lavados con PBS con BSA al 1% durante 10 minutos, se incubaron con el primer anticuerpo diluido en PBS/BSA 1% durante una hora a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar tres veces con PBS/BSA 1% y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti inmunoglobulinas de conejo o de ratón unido a un fluorocromo)

durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron dos veces con PBS/BSA 1%, una vez con agua destilada y se resuspendieron en una solución que contenía Mowiol (Calbiochem) al 10% y glicerol al 25% en 100mM Tris HCL pH 8.5 en PBS.

Las células T CD4, enriquecidas negativamente a partir de PBMC mediante separación magnética (Miltenyi Biotec), se marcaron con fluorescencia verde (CellTracker, Molecular Probes).

Los portas se conservaron a 4°C y en la oscuridad hasta que se visualizaron en un microscopio confocal (Radiance2100, Bio-Rad). Las imágenes se procesaron con los programas Metamorph v6 (Universal Imaging Corporation) y Photoshop 7.0 (Adobe Inc.).

### 3.2.6 Purificación de ARN viral

Se procedió al aislamiento y purificación del ARN viral contenido en muestras de plasma de pacientes utilizando “ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System” (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN viral se aisló partiendo de 500 µl de cada muestra de plasma. Estas se centrifugaron a 23500 g durante una hora a una temperatura de 4°C, para concentrar los viriones en un pellet. Tras eliminar el sobrenadante, se lisaron los viriones y precipitó el ARN viral con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. Realizados estos pasos, el ARN se resuspendió en un diluyente y se conservó a -80°C.

### 3.2.7 Amplificación del gen *env*

La amplificación del gen *env* de VIH-1, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tiene el objetivo principal de amplificar 2700 pb que incluyen el gen completo de la envoltura del virus, con el fin de construir virus VIH recombinantes con las proteínas de la envoltura codificadas por el gen *env* que hemos amplificado por PCR. La amplificación se realiza en dos pasos:

- ◆ RT-PCR, que incluye un primer ciclo para la síntesis de ADNc a 45°C durante 45 minutos seguido de la desnaturalización del ADN a 94°C durante 2 minutos. La amplificación consta de 30 ciclos, empezando por la desnaturalización del ADN a 94°C durante 30 segundos, un paso de hibridación con los oligonucleótidos a 55°C durante 1 minuto y la elongación a 68°C durante 3 minutos. Durante los últimos 20 ciclos el tiempo de elongación por la polimerasa aumenta 20 segundos por cada ciclo. Por último, tiene lugar un ciclo de elongación final a 68°C durante 10 minutos.

- ◆ PCR anidada con oligonucleótidos específicos que contienen dianas de restricción para Xba I [TCTAGA] y para Not I [GCGGCCGC]. La primera reacción consiste en la desnaturalización del ADN a 94°C durante 2 minutos. La amplificación consta de 35 ciclos, empezando por la desnaturalización del ADN a 94°C durante 30 segundos, un paso de hibridación con los oligonucleótidos a 55°C durante 1 minuto y la elongación a 68°C durante 3 minutos. Durante los últimos 20 ciclos el tiempo de elongación por la polimerasa aumenta 20 segundos por cada ciclo. Por último, tiene lugar un ciclo de elongación final a 68°C durante 10 minutos.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) utilizando los oligonucleótidos descritos (Tabla 3-1).

### 3.2.8 Secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó en un volumen de 10µl conteniendo: la mezcla de reacción con los terminadores marcados con rodamina (A-Dye dicloro[R6G], C-Dye dicloro[ROX], G-Dye dicloro[R110], T-Dye dicloro[TAMRA]); deoxinucleotidos trifosfato; ADN polimerasa Taq; MgCl<sub>2</sub> y tampón Tris-HCl pH 9.0 (ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits); dimetilsulfóxido; los oligonucleótidos a una concentración 0.5 µM y 300 ng de los vectores.

Las muestras se desnaturalizaron a 94°C durante 3 minutos y se realizaron 25 ciclos de amplificación de la siguiente manera: desnaturalización a 94°C durante 10 segundos, hibridación de los oligonucleótidos a 50°C durante 5 segundos y extensión a 60°C durante 4 minutos.

Estas muestras se precipitaron y se secuenciaron en un secuenciador ABI 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Salud Carlos III.

Las secuencias se procesaron y alinearon mediante los programas Chromas 1.61 (Technelysium Pty Ltd), SeqMan II (DNASTAR Inc.), MACAW versión 2.0.5 (NCBI) y ClustalW (EMBL-EBI).

### 3.2.9 Mutagénesis dirigida

Se empleó el sistema de mutagénesis *in vitro* “QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit” (Stratagene) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Este método consiste en la amplificación de un plásmido molde mediante PCR con dos oligonucleótidos



que contienen la mutación de interés. Cada uno de los oligonucleótidos es complementario a una de las hebras del vector en el que se quiere introducir la mutación. Los oligonucleótidos empleados en cada reacción de mutagénesis dirigida se detallan en el apartado Material (Tabla 3-1). El producto de la amplificación se trató durante 1 hora a 37°C con 10 unidades de la endonucleasa Dpn I, específica de ADN metilado, con el fin de digerir las hebras del plásmido utilizado como molde. Finalmente, se transformaron las bacterias competentes *E. coli* XL1-Blue con 1 µl del ADN tratado con Dpn I.

### **3.2.10 Ligación y transformación de las bacterias DH5α**

Las ligaciones se realizaron a 16 °C durante toda la noche usando 1 U de la ligasa del fago T4 (New England BioLabs). Con dichas ligaciones se transformaron por choque térmico las bacterias competentes *E. coli* DH5α.

La presencia del marcador *lacZ* en el plásmido pNL-*lacZ*/env-Ren permite seleccionar bacterias con plásmidos recombinantes tras un experimento de clonación. Para ello, las bacterias DH5α transformadas se siembran en una placa de LB agar que contiene X-Gal e IPTG.

### **3.2.11 Purificación de ADN**

Los plásmidos se purificaron utilizando los sistemas “Wizard® Plus SV Minipreps” (Promega) y “Qiagen Plasmid Maxi y Midi Kit” (Izasa), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos métodos se basan en la lisis alcalina y la purificación del ADN por medio de columnas de intercambio iónico.

Los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR y los obtenidos tras digestión enzimática se purificaron utilizando las columnas “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare).

### **3.2.12 Transfección de HEK 293T**

Las partículas virales se generaron mediante una transfección con fosfato cálcico de células HEK 293T con los plásmidos. Las células HEK 293T se sembraron en una placa de 6 pocillos a una concentración de  $5 \times 10^5$  células por pocillo. A las 24 horas se añadió cloroquina a cada pocillo a una concentración final de 25 µM. A estas células se les añadió una mezcla que contenía 10 µg del plásmido a transfectar, CaCl<sub>2</sub> 2M y HBS. Se cambió el medio DMEM

a las 8 y 24 horas de la transfección. A las 48 horas se recogieron los sobrenadantes conteniendo las partículas virales y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.13 Detección de la proteína p24 del VIH

Se cuantificaron los niveles de la proteína Gag p24 del VIH en los sobrenadantes de 293T mediante un ELISA para la detección del antígeno p24 (INNOTEST® HIV Antigen mAb, Innogenetics).

### 3.2.14 Sistemas de infección

En los ensayos de caracterización del tropismo viral (apartados 4.1 y 4.2), las células GHOST y las U87 se distribuyeron en placas de 96 pocillos a una concentración de  $2 \times 10^4$  células por pocillo y se infectaron con 50  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes recogidos tras la transfección de las células 293T en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ . Los linfocitos activados se distribuyeron a una concentración de  $5 \times 10^4$  células por pocillo y se mantuvieron en medio RPMI-1640 completo suplementado con IL-2. A las 48 horas de la infección se lisaron las células recogiendo los sobrenadantes en los que se midió la actividad luciferasa mediante cuantificación lumínica en un luminómetro (Orion, Berthold Detection Systems). La actividad luciferasa detectada se expresa en unidades relativas de luz (RLU).

Para estudiar la cinética de replicación de los virus JRRen y 11525Ren (apartado 4.1.4.1), se infectaron  $1 \times 10^6$  linfocitos activados con 5 ng de proteína Gag p24 de cada virus. Después de 2 horas de adsorción viral, las células se lavaron 4 veces con 15 ml de PBS y se cultivaron en una placa de 24 pocillos, a una concentración de  $5 \times 10^5$  células por ml en RPMI-1640 completo suplementado con IL-2 en un volumen final de 2 ml. Cada 24 horas se midió la actividad luciferasa de los lisados celulares, recogiendo 500  $\mu\text{l}$  de medio con células y reponiendo con medio nuevo. Además, para medir la infectividad viral y la estabilidad de la luciferasa Renilla, los linfocitos activados se infectaron con los sobrenadantes de infecciones previas y se cultivaron durante 5 días, momento en el que se midió la actividad luciferasa de los lisados celulares.

Para analizar la propagación de los virus R5 y X4 en la sinapsis virológica (apartado 4.3), las células dendríticas, cultivadas en placas de 6 pocillos, se incubaron durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  con los virus a una dosis de 200 ng de proteína Gag p24 por pocillo. Tras este tiempo de

adsorción, se realizaron seis lavados con 10 ml de PBS por pocillo, para eliminar el virus no unido, y se añadieron  $5 \times 10^6$  linfocitos activados en 3 ml de medio RPMI completo con IL-2.

Los linfocitos activados ( $5 \times 10^6$ ) se cultivaron durante 2 horas con los virus a una dosis de 40 ng de proteína Gag p24 por cada millón de células. Se realizaron seis lavados con 10 ml de PBS por pocillo y se les añadió RPMI-1640 completo suplementado con IL-2.

Las células dendríticas se incubaron durante 2 horas a  $37^\circ\text{C}$  con los virus a una dosis de 200 ng de proteína Gag p24 por pocillo. Tras este tiempo de adsorción, se realizaron seis lavados con 10 ml de PBS por pocillo y se incubaron en 3 ml de medio RPMI.

Cuando los ensayos de infección se realizaron añadiendo ambos virus, NL4-3 y JR-CSF, en el mismo pocillo (apartado 4.3.6), las MDC se incubaron durante 2 horas con idénticas concentraciones de p24 (200 ng de cada uno), se realizaron los lavados y añadieron los linfocitos activados. Se midió la actividad luciferasa en las células lisadas 48 horas después de la infección. La mitad de las células se midieron con los reactivos de “Renilla Luciferase Assay System” y la otra mitad con “Luciferase Assay System”.

En los experimentos de infección mostrados en el apartado 4.3.9, las MDC se incubaron con  $30 \mu\text{g/ml}$  del anticuerpo K15C o con una cantidad igual de la inmunoglobulina IgG2a (control de isotipo) durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , antes de cultivarlas con los linfocitos.

En otros ensayos (apartado 4.3.5), después de incubar las MDC con los virus y realizar los lavados con PBS, las células se trataron con medio libre de suero o con tripsina al 0,1% durante 10 minutos. La proteólisis se paró añadiendo medio RPMI completo. Luego se añadieron  $5 \times 10^6$  linfocitos activados para proseguir con la infección o se procedieron a marcar un anticuerpo frente a DC-SIGN para su posterior análisis en el citómetro de flujo.

En todos los experimentos de infección de linfocitos cultivados con DC autólogas, descritos previamente, las células se lisaron a las 48 horas de la infección, recogiendo los sobrenadantes en los que se midió la actividad luciferasa mediante cuantificación lumínica en un luminómetro Sirius (Berthold Detection Systems).

En los experimentos del confocal, las MDC se incubaron durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  con los virus a una dosis de 200 ng de proteína Gag p24. Para eliminar los virus no absorbidos, se realizaron varios lavados con PBS. Para facilitar la formación de conjugados, las MDC con los virus se mezclaron con  $5 \times 10^5$  células T CD4 a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma), con o sin la inclusión del anticuerpo K15C. Por último, las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron como se detalla en el apartado 3.2.5.

### **3.2.15 Transfección de las MDC con los vectores pSUPER-siCXCL12**

Las MDC ( $5 \times 10^6$ ) se transfectaron con 5  $\mu\text{g}$  del plásmido control pSUPER o con las construcciones pSUPER-siCXCL12 utilizando el equipo “Human dendritic cell nucleofector™” (Amaxa), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para valorar la eficiencia de la transfección, las MDC se transfectaron con 5  $\mu\text{g}$  del plásmido control, pmaxGFP™, y a las 24 horas se realizó el análisis citométrico de la expresión de GFP.

### **3.2.16 Ensayos de migración de células**

La quimiotaxis en respuesta a quimiocinas se determinó midiendo el número de células migradas a través de un filtro de policarbonato, con un tamaño de poro de 3  $\mu\text{m}$ , en cámaras de cultivo Transwell® (Corning). En la cámara superior de cada pocillo se depositaron  $5 \times 10^5$  PBMC diluidas en 100  $\mu\text{l}$  de medio RPMI 1640 sin o con T134 (2  $\mu\text{M}$ ), y en la cámara inferior 600  $\mu\text{l}$  de medio, de medio suplementado con CXCL12 (200 nM) o de sobrenadantes de DC. Las PBMC que habían migrado a la cámara inferior, después de 2 h a 37°C, se recogieron y contaron con un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson) usando el programa CellQuest (BD Biosciences).

---

## 4 RESULTADOS

---

### 4.1 DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA EL ESTUDIO DEL TROPISMO DEL VIH-1 BASADO EN LA GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES

Además de los aspectos cuantitativos de la replicación viral, en el estudio de la progresión del VIH es importante analizar los aspectos cualitativos del virus, como el tropismo viral o capacidad del VIH de entrar en la célula a través de distintos receptores.

Los métodos de estudio del tropismo viral existentes hasta el momento mostraban varias limitaciones técnicas. Por tanto, para estudiar los virus obtenidos de pacientes se hacía necesario desarrollar otro sistema y, basándonos en la experiencia previa en nuestro laboratorio con virus recombinantes en la polimerasa, abordamos la generación de virus recombinantes en la envuelta (Alcamí Pertejo y col., 2005).

#### 4.1.1 Generación de virus luciferasa Renilla con los distintos tropismos conocidos

El primer paso consistió en generar una serie de vectores que nos sirvieran de referencia. El plásmido pNL4-3Ren (García-Pérez y col., 2007), del que disponíamos en el laboratorio, contiene una envuelta con tropismo X4. Generamos vectores que poseían envueltas virales de virus con los otros dos tropismos: el plásmido pJRRen (R5) y el vector p89.6Ren (R5X4), cuya construcción se detalla en el apartado 3.1.13.

Con estos vectores se transfectaron las células 293T y la progenie viral, así producida, se utilizó para la infección de células diana que expresan selectivamente los receptores CXCR4 o CCR5, así como de linfocitos activados con PHA e IL-2 (Tabla 4-1).

Tabla 4-1. Infección de distintas líneas celulares con los virus de referencia

	P	GHOST			U87		Linfocitos activados
		CCR5	CXCR4	CD4	CD4.CCR5	CD4.CXCR4	
<b>NL4-3Ren</b>	346000 ±57000	417000 ±27000	4810000 ±220000	7960 ±440	7190 ±620	5560000 ±670000	373000 ±64000
<b>JRRen</b>	5400 ±1800	5870000 ±290000	4590 ±790	7900 ±1400	1420000 ±150000	1050 ±300	87300 ±2000
<b>89.6Ren</b>	72800 ±3600	870000 ±130000	3610000 ±580000	2507 ±97	34200 ±2400	540000 ±140000	703000 ±56000

Se detallan los valores de RLU/s +/- el error de la media.

Los resultados obtenidos demuestran que somos capaces de predecir el tropismo mediante el clonaje de la envuelta y la generación de virus quiméricos utilizando la metodología descrita.

En las células GHOST y U87 los valores de RLU/s fueron significativamente mayores (en torno a un orden de magnitud) que en los linfocitos. A la vista de estos resultados, decidimos utilizar ambos tipos celulares indistintamente en los experimentos de determinación de tropismo. Sin embargo, observamos un nivel de fondo significativo en las células GHOST parentales y GHOST CCR5 infectadas con el virus X4, NL4-3Ren, debido a que dichas células expresan niveles bajos de CXCR4 en su superficie, lo que se tuvo en cuenta para la interpretación de los resultados.

#### 4.1.2 Sistemas para la generación de virus recombinantes que portan la envuelta de la población viral del paciente

En una segunda fase, nos planteamos como objetivo generar virus recombinantes portadores de la envuelta de virus de pacientes seropositivos como sistemas de estudio del tropismo y otras características de la envuelta viral.

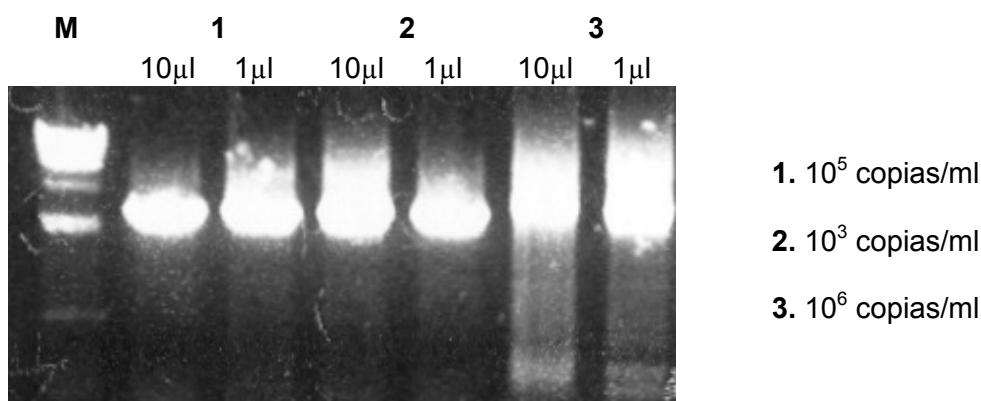
A partir de plasma del paciente se realiza la extracción del ARN del VIH. El ARN viral es retrotranscrito y posteriormente amplificado mediante una RT-PCR y una PCR anidada, según se describe en el capítulo de Material y Métodos.

Los oligonucleótidos se diseñaron cumpliendo los siguientes criterios:

- Se alinearon 150 secuencias de envueltas de aislados virales (MACAW versión 2.0.5) y se seleccionaron, dentro de las zonas de interés para la hibridación con los oligonucleótidos, las regiones más conservadas en secuencia.
- Se diseñaron oligonucleótidos para los distintos subtipos del VIH.

- Los oligonucleótidos empleados en la PCR anidada incluyen sitios de restricción específicos para el posterior clonaje en el vector pNL-lacZ/env-Ren.

Partiendo de ARN viral extraído de muestras de pacientes con distintas cargas virales hemos determinado desde qué umbral podemos amplificar la envuelta. Se trata de un amplificado de gran tamaño (2,7 kb) en lo que radica la dificultad a la hora de diseñar las condiciones de amplificación. Conseguimos amplificar la envuelta con una alta eficacia a partir de muestras de pacientes con cargas virales superiores a  $10^3$  copias de ARN viral por mililitro (Figura 4-1).



**Figura 4-1. Amplificación de un fragmento de 2700 pb que incluye el gen *env* completo.** M: marcador de peso molecular  $\lambda$ HindIII. Sobre la fotografía se detalla la cantidad de ARN viral utilizada como molde en la RT-PCR.

Se estudió la eficiencia de la amplificación de la envuelta con este sistema partiendo de 41 plasmas de pacientes con distintas cargas virales. La eficiencia de la amplificación fue de 92,68%, siendo está menor en las muestras con carga viral más baja (Tabla 4-2).

**Tabla 4-2. Eficiencia de la amplificación del gen *env* según la carga viral**

Carga viral	Número de muestras	Muestras amplificadas	%
$10^3$ - $10^4$	5	4	80,00
$10^4$ - $10^5$	16	15	93,75
$10^5$ - $10^6$	11	10	90,91
$>10^6$	9	9	100,00

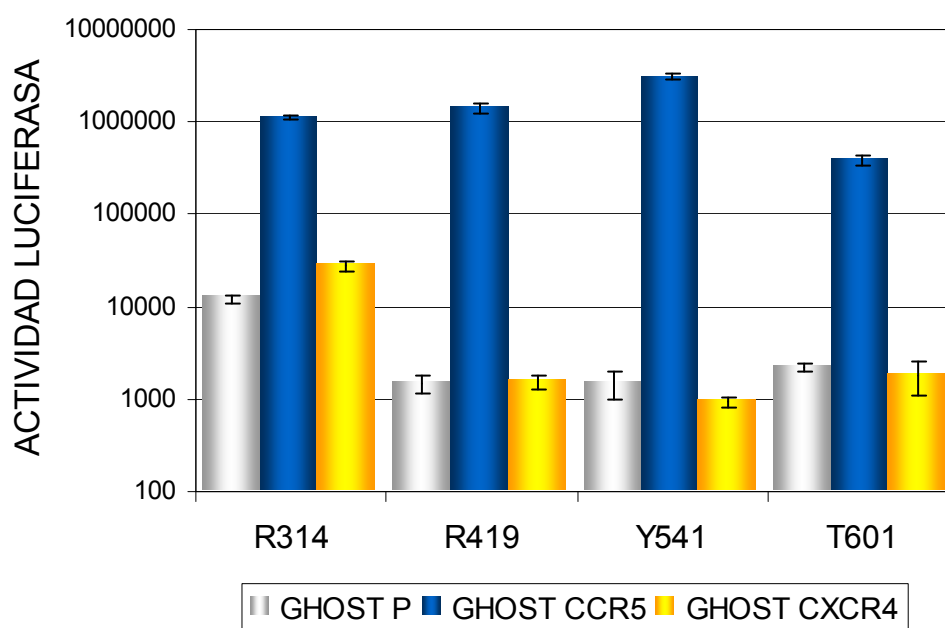
Además, valoramos la representatividad de la población seleccionada mediante la amplificación de una décima parte del ARN viral. Una amplificación positiva de esta dilución se considera un marcador de representatividad de la población viral en la muestra 10 veces más concentrada.

Tras la digestión enzimática del amplificado, este se clona en el plásmido pNL-lacZ/env-Ren. Las bacterias transformadas con los plásmidos que hayan incorporado el gen *env* completo aparecerán de color blanco, y las que contengan plásmidos religados sin dicho inserto serán de color azul. Consideramos representativo de la población viral, la aparición de más de 200 colonias blancas y un porcentaje menor al 5% de colonias azules.

La población de vectores recombinantes generados se transfecta en la línea celular 293T que actúa como célula productora de virus recombinantes. La progenie infecciosa de virus recombinantes se recoge a las 48 horas de la transfección y se utiliza para infectar la línea celular diana.

#### 4.1.3 Caracterización del tropismo viral en la infección por el VIH-1 con los sistemas desarrollados

Siguiendo las condiciones anteriormente descritas, obtuvimos virus recombinantes con la envuelta de virus de distintos pacientes. Estos virus recombinantes nos permiten determinar el tropismo de los virus por ensayos de infección en líneas celulares GHOST, que expresan el receptor CD4 y el correceptor CCR5 o CXCR4.



**Figura 4-2. Caracterización del tropismo de virus de pacientes con el sistema desarrollado.** Las células GHOST se infectaron con los sobrenadantes de las células 293T transfectadas con el ADN de los virus recombinantes que contienen la envuelta de la población viral. Las células se lisaron a las 48 horas de la infección y se midió la actividad luciferasa. El virus del paciente R314 presenta un tropismo dual mientras que los otros exhiben tropismo R5. Los datos representan la media de triplicados de las infecciones +/- el error de la media.

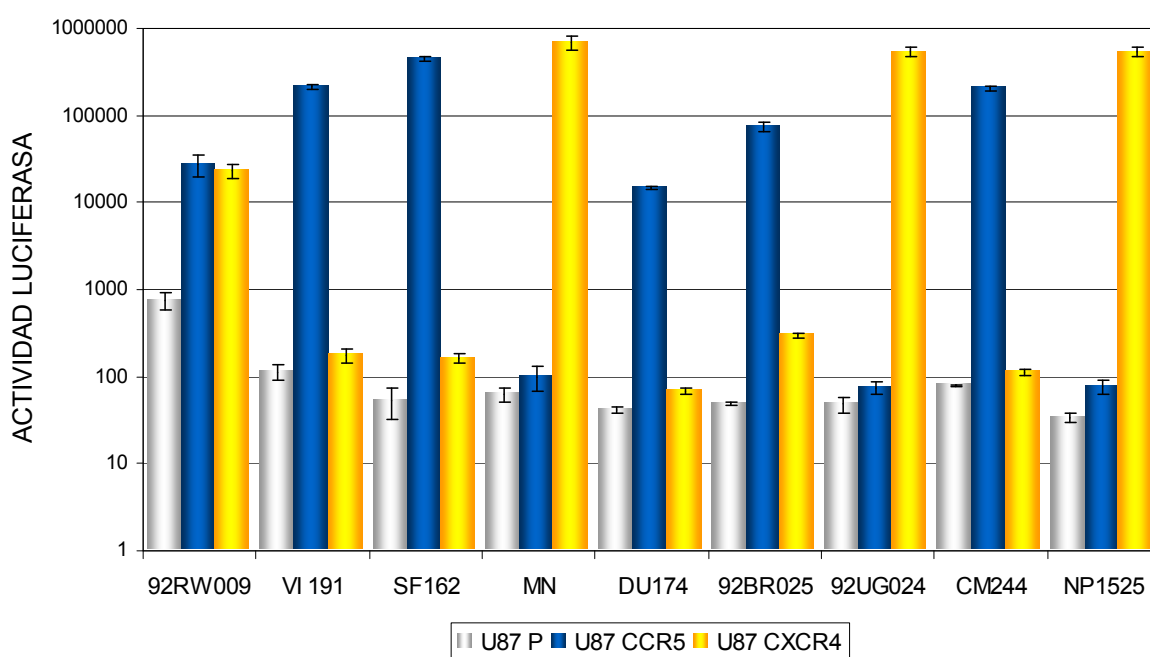


**Tabla 4-3. Tropismo de los virus recombinantes con envueltas de pacientes**

Número de muestra	GHOST P	GHOST CCR5	GHOST CXCR4	Tropismo
<b>R314</b>	12300 ± 1200	1113000 ± 42000	27900 ± 3600	R5X4
<b>R419</b>	1460 ± 330	1410000 ± 150000	1540 ± 250	R5
<b>Y541</b>	1500 ± 490	3090000 ± 270000	940 ± 110	R5
<b>T601</b>	2220 ± 220	386000 ± 42000	1800 ± 700	R5

Se detallan los valores de RLU/s +/- el error de la media.

Para valorar la eficacia de nuestro sistema en la amplificación de envueltas de subtipos no-B, generamos virus recombinantes con la envuelta de virus de distintos subtipos (A, B, C, D, E). El tropismo de estos virus ya ha sido analizado y caracterizado por otros grupos. Los resultados obtenidos con el sistema desarrollado coincidieron con los previamente descritos.



**Figura 4-3. Caracterización del tropismo de virus recombinantes con envueltas de distintos subtipos.** Las células U87 se infectaron con los sobrenadantes de las células 293T transfectadas con el ADN de los virus recombinantes. Las células se lisaron a las 48 horas de la infección y se midió la actividad luciferasa. Los datos representan la media de triplicados de las infecciones +/- el error de la media.

Tabla 4-4. Tropismo de los virus recombinantes con envueltas de distintos subtipos

Número de muestra	Subtipo env	U87 CD4	U87 CD4.CCR5	U87 CD4.CXCR4	Tropismo obtenido	Tropismo descrito
92RW009	A	750 ±170	27800 ±8000	23100 ±4300	R5X4	R5X4
VI 191	A	113 ±22	213000 ±11000	174 ±30	R5	R5
SF162	B	53 ±21	450000 ±29000	164 ±20	R5	R5
MN	B	62 ±11	100 ±32	700000 ±130000	X4	X4
DU174	C	42 ±3	14630 ±730	68 ±7	R5	R5
92BR025	C	49 ±2	74600 ±9700	297 ±18	R5	R5
92UG024	D	49 ±10	75 ±13	539000 ±58000	X4	X4
CM244	E	79 ±2	206000 ±11000	111 ±8	R5	R5
NP1525	E	33 ±4	77 ±14	540000 ±58000	X4	X4

Se detallan los valores de RLU/s +/- el error de la media.

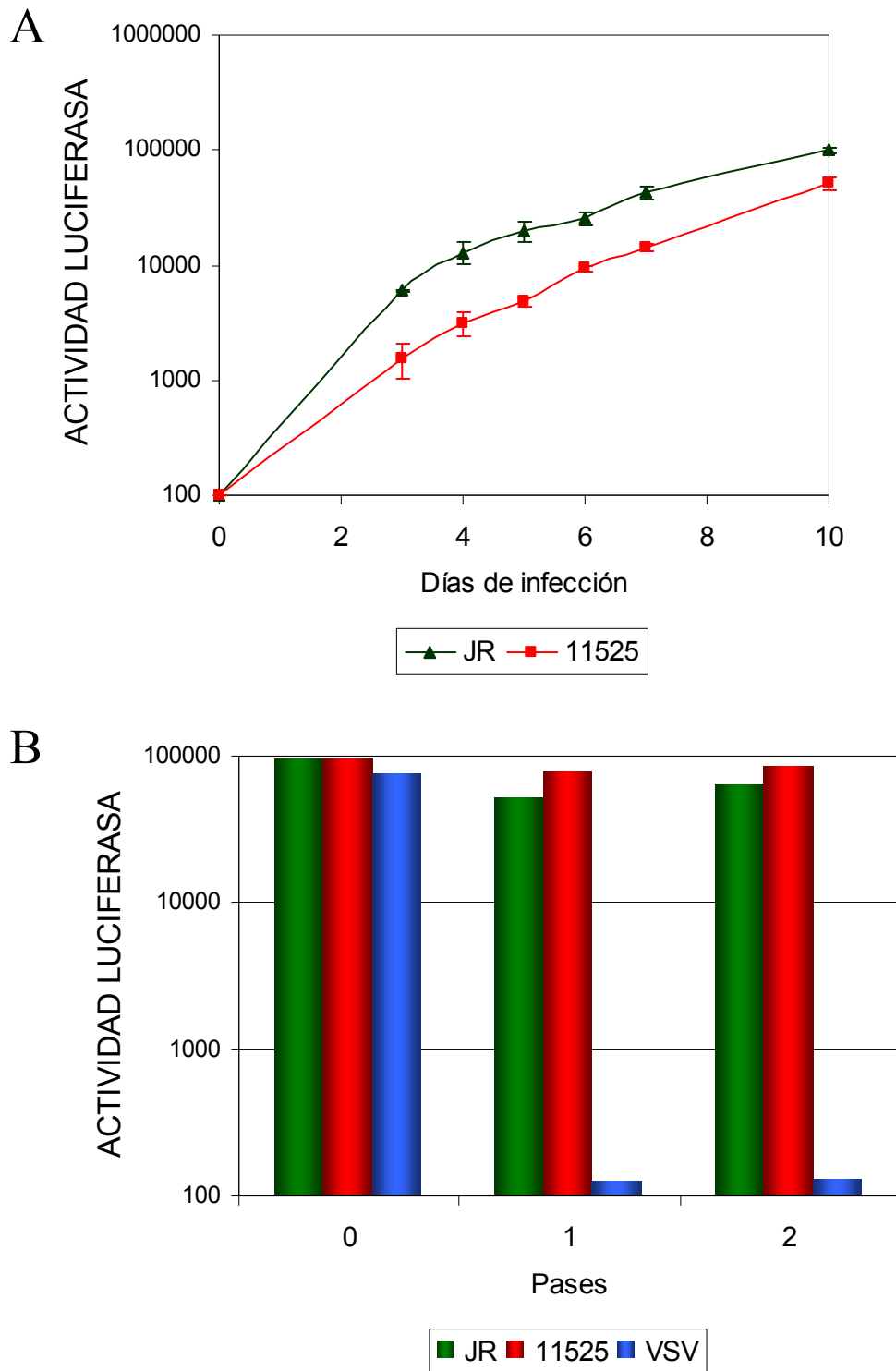
#### 4.1.4 Características del sistema desarrollado

##### 4.1.4.1 Ciclo múltiple

Una de las ventajas de nuestro sistema en comparación con otros modelos de virus recombinantes es la generación de virus quiméricos capaces de generar varios ciclos de replicación.

Para demostrar esta característica, se analizó la cinética de replicación del virus recombinante JRRen, previamente descrito, y de un virus recombinante con una envuelta procedente de plasma de paciente, 11525Ren. Ambos virus mostraron unas curvas de replicación productivas en linfocitos activados con PHA e IL-2 (Figura 4-4 A).

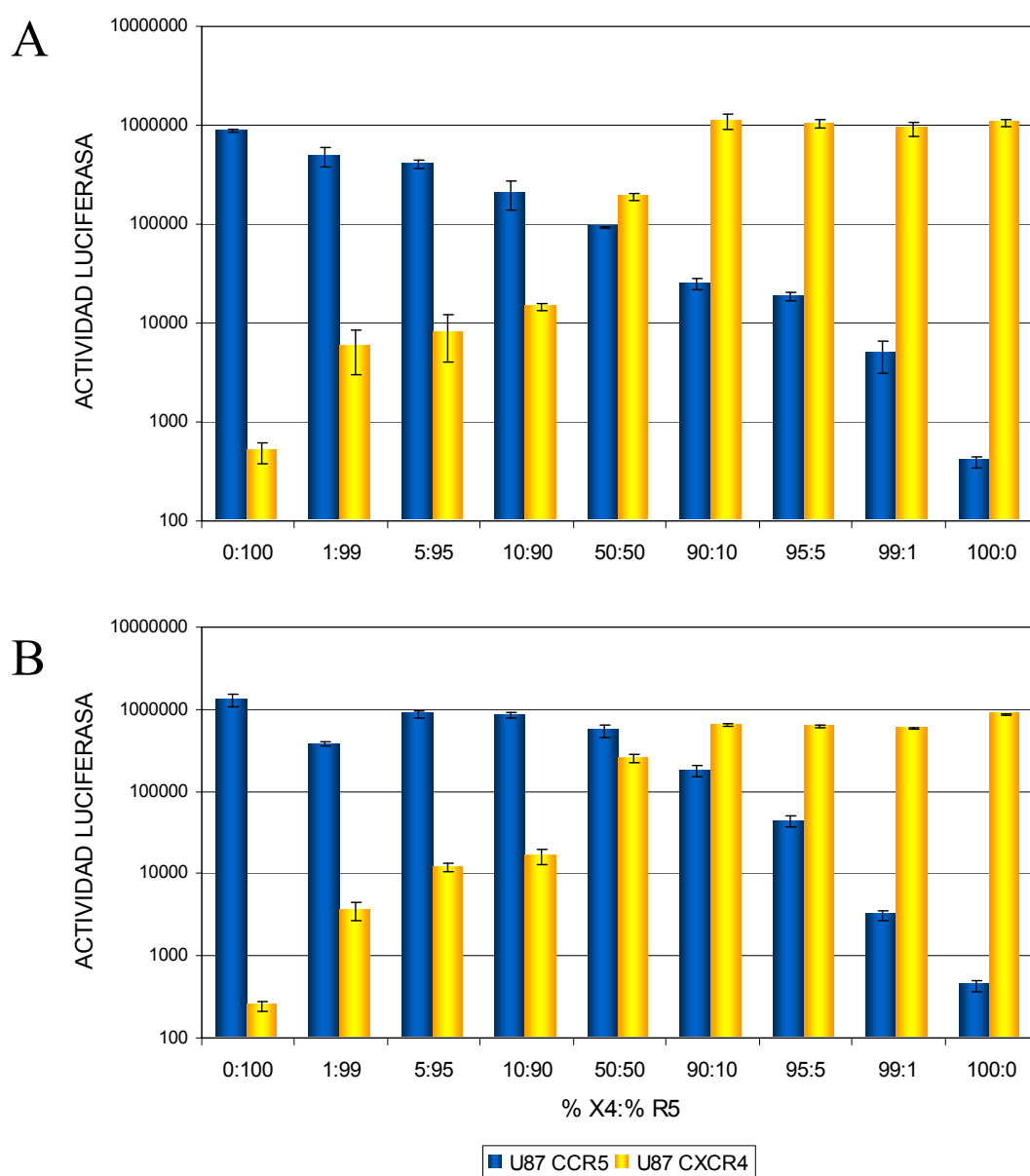
Además, se realizaron dos pases seriados en linfocitos activados, con ambos virus y con el virus pseudotipado NL4-3VSVRen, y se midió la actividad luciferasa en los lisados celulares para cada pase. Como se esperaba, el virus NL4-3VSVRen realizó un único ciclo de replicación mientras que los otros dos virus fueron capaces de propagar durante los dos pases consecutivos (Figura 4-4 B). Se obtuvo un nivel de actividad luciferasa similar en todos los pases, lo que sugiere que hay una expresión estable de la luciferasa Renilla después de varios ciclos virales de replicación.



**Figura 4-4. Los virus recombinantes en *env* realizan varios ciclos de replicación. (A)** Cinéticas de replicación en linfocitos, activados con PHA e IL-2, de los virus JRRen y 11525Ren durante 10 días de infección. Los datos representan la media de duplicados de las infecciones +/- el error de la media. **(B)** Medida de la actividad luciferasa después de varios ciclos de replicación. Los linfocitos activados se infectaron con los virus JRRen, 11525Ren o NL4-3VSVRen durante 5 días. Se realizaron dos pases consecutivos con los sobrenadantes de las infecciones previas. Se midió la actividad luciferasa en los lisados celulares.

#### 4.1.4.2 Sensibilidad para la detección de variantes minoritarias

Con el objetivo de medir la capacidad del método para detectar poblaciones virales minoritarias, se mezclaron a distintas proporciones clones moleculares de variantes con envueltas de tropismo R5 y X4. En estos experimentos, siempre se pudieron detectar las variantes minoritarias, tanto de tropismo R5 como X4, cuando se encontraban en la frecuencia más baja analizada (1%).



**Figura 4-5. Sensibilidad en la detección de variantes minoritarias.** Las células U87 se infectaron con los sobrenadantes de las células 293T transfectadas con mezclas a distintas proporciones del ADN de los clones virales con envueltas X4 y R5. En el eje de abcisas se detallan los distintos porcentajes a los que se mezcló el ADN viral de un clon X4 con un R5. Las células se lisaron a las 48 horas de la infección y se midió la actividad luciferasa. Los datos representan la media de triplicados de las infecciones +/- el error de la media. **(A)** Mezclas entre los clones virales MN (X4) y CM244 (R5). **(B)** Mezclas entre los clones virales NP1525 (X4) y SF162 (R5).

## **4.2 DETERMINACIÓN DEL TROPISMO DE LOS VIRUS CIRCULANTES EN PACIENTES EN EL ESTADIO DE PRIMOINFECCIÓN, INFECTADOS POR LAS TRES VÍAS DE TRANSMISIÓN: SEXUAL, INTRAVENOSA Y VERTICAL**

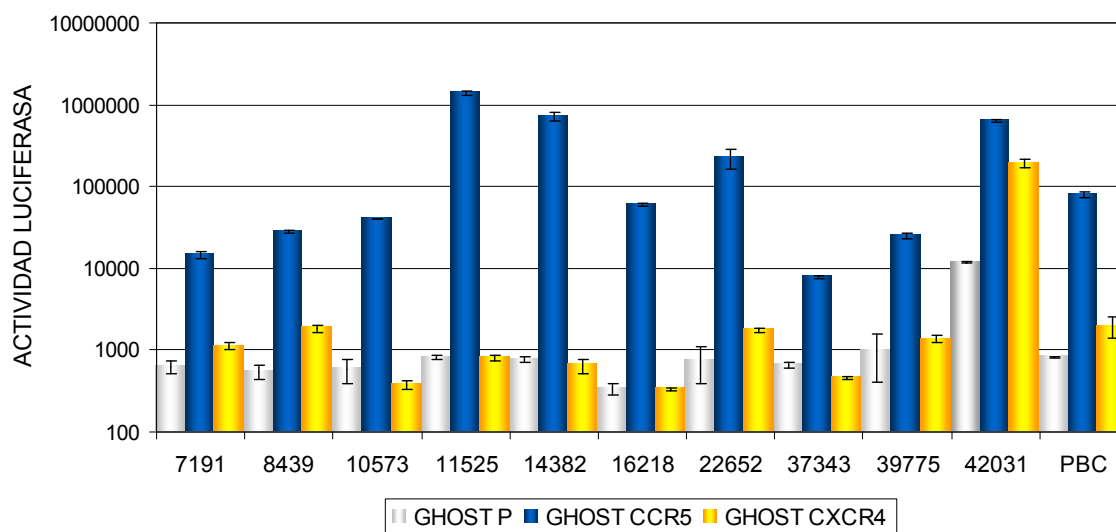
### **4.2.1 Determinación del tropismo de los virus de los pacientes primoinfectados**

Se ha explicado la selección de virus R5 durante la primoinfección por vía sexual como consecuencia de la producción de CXCL12 por células epiteliales (Agace y col., 2000). Pero este hecho no dilucida los procesos involucrados en la selección de variantes durante la primoinfección por vía intravenosa y transmisión vertical. Por este motivo, analizamos el tropismo de las variantes existentes en pacientes infectados por estas tres vías de transmisión, con la intención de demostrar que la selección de variantes R5 se produce en los tres casos.

Las características de los pacientes infectados por las tres vías de transmisión se detallan en el apartado 3.1.15. Se trata de muestras obtenidas antes de que el sujeto infectado seroconvirta e inicie el tratamiento antirretroviral. Realizamos un análisis fenotípico y genotípico de las poblaciones virales presentes en los donantes infectados por transmisión sexual, parenteral y vertical.

#### **4.2.1.1 Transmisión sexual**

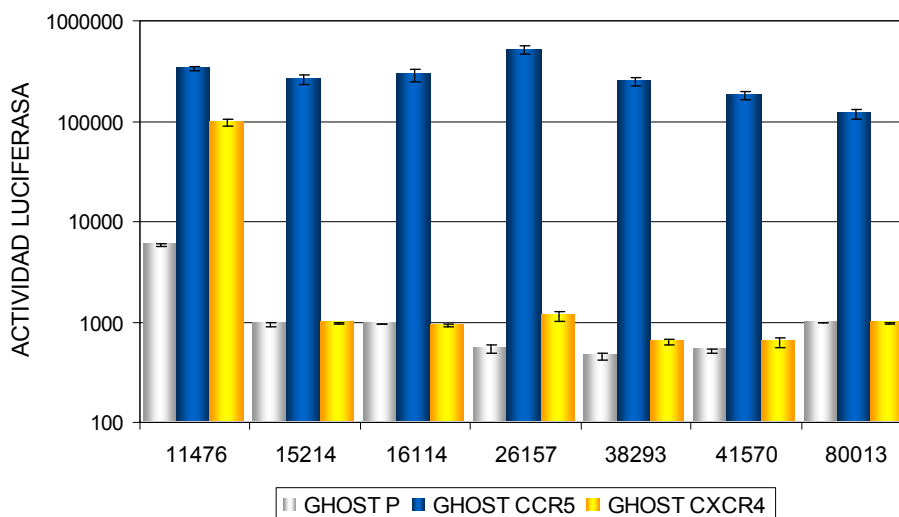
Determinamos el tropismo que presentaban los virus de un grupo de 11 pacientes infectados por vía sexual mediante el sistema de virus recombinantes (Figura 4-6). La mayoría de los virus utilizaron el correceptor CCR5 para su entrada en la célula, presentando sólo uno de ellos tropismo R5X4.



**Figura 4-6. Análisis de la utilización de correceptor por las Env de pacientes primoinfectados por vía sexual en experimentos de infección.** Las células GHOST se infectaron con los sobrenadantes de las células 293T transfectadas con el ADN de los virus recombinantes que contienen la envuelta de la población viral. Las células se lisaron a las 48 horas de la infección y se midió la actividad luciferasa. Los datos representan la media de triplicados de las infecciones +/- el error de la media.

#### 4.2.1.2 Transmisión parenteral

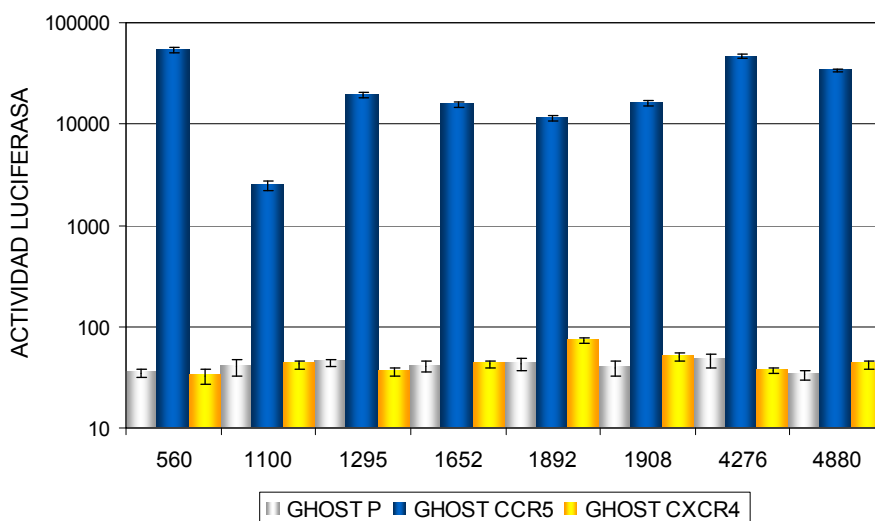
También estudiamos el tropismo viral durante la primoinfección en adictos a drogas, acerca del cual hay escasos datos publicados. Entre los pacientes infectados por vía intravenosa (Figura 4-7), seis de ellos estaban infectados con virus R5 frente a uno infectado con virus R5X4.



**Figura 4-7. Análisis de la utilización de correceptor por las Env de pacientes primoinfectados por vía parenteral en experimentos de infección.** Las células GHOST se infectaron con los sobrenadantes de las células 293T transfectadas con el ADN de los virus recombinantes que contienen la envuelta de la población viral. Las células se lisaron a las 48 horas de la infección y se midió la actividad luciferasa. Los datos representan la media de triplicados de las infecciones +/- el error de la media.

#### 4.2.1.3 Transmisión vertical

En todos los casos de transmisión vertical analizados (Figura 4-8), los niños estaban infectados con virus de tropismo R5.



**Figura 4-8. Análisis de la utilización de correceptor por las Env de pacientes primoinfectados por transmisión vertical en experimentos de infección.** Las células GHOST se infectaron con los sobrenadantes de las células 293T transfectadas con el ADN de los virus recombinantes que contienen la envuelta de la población viral. Las células se lisaron a las 48 horas de la infección y se midió la actividad luciferasa. Los datos representan la media de triplicados de las infecciones +/- el error de la media.

Como resultado de estos experimentos, podemos afirmar que durante la primoinfección aparecen predominantemente cepas con tropismo R5. Ninguno de los virus analizados poseía tropismo X4 exclusivo y en escasos pacientes se obtuvieron virus con tropismo dual. Esto indica que hay un factor de selección negativa de los virus X4 por las tres vías de transmisión.

#### **4.2.1.4 Análisis de las secuencias del dominio variable V3 de la población viral de los pacientes en el estadio de primoinfección**

La carga y secuencia de los dominios V3 a pH fisiológico, también se pueden utilizar como un indicador de tropismo del VIH-1. Se ha descrito (Fouchier y col., 1992) que los virus R5X4 y X4 contienen secuencias más heterogéneas en la región V3, con una carga positiva mayor que los virus R5.

Todas las secuencias V3, excepto la del 42031, presentaron una carga neta de +2, +3 ó +4, consistente con un fenotipo R5 (Tabla 4-5).

La presencia de un aminoácido neutro, sin carga (S o G) en posición 11 y uno cargado negativamente (D o E) en posición 25 correlaciona con un fenotipo R5. Mientras que, un residuo básico en estas posiciones, que incrementa la carga positiva total del dominio V3, puede cambiar el fenotipo de R5 a X4 (Fouchier y col., 1992).

Todos los virus muestran una serina o glicina en la posición 11 (Tabla 4-5). En la mayoría de los casos, un aminoácido cargado negativamente (D o E) está presente en la posición 25. El virus de tropismo dual 42031 contiene un residuo arginina (R) en dicha posición, lo que contribuye a una carga total del dominio V3 de +5.



Tabla 4-5. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la región V3

Muestra	Secuencia V3	Nº aa	Carga
<i>Transmisión sexual</i>			
NL4-3	CTRPNNNTRK <b>S</b> IRIQRGPGRAFVTIG-KIGNMRQAHC	36	8,01
JR-CSF	CTRPSNNTRK <b>S</b> IHI--GPGRAFYTTG <b>E</b> IIGDIRQAHC	35	3,18
7191	CIRPNNNTRR <b>S</b> INI--GPGRAFYATG <b>D</b> IIGNIRQAYC	35	3,85
8439	CMRPNNNTRK <b>S</b> IHI--GPGRAFYATG <b>D</b> IIGNIRQAHC	35	4,18
10573	CTRPNNNTRK <b>S</b> IHI--GPGRALYTTG <b>E</b> IIGDIRQAHC	35	3,18
11525	CTRPNNNTRR <b>S</b> IHM--GPGRAFYTTG <b>D</b> IIGDIRKAYC	35	4,01
14382	CTRPNNNTRK <b>S</b> IHI--GPGRALYTTG <b>E</b> IIGDIRQAHC	35	3,18
16218	CTRPNNNTRK <b>S</b> IHI--GPGRALYTTG <b>E</b> IIGDIRQAHC	35	3,18
22652	CIRPNNNTRR <b>S</b> ITI--GPGRAFYTTG <b>E</b> IIGDIRQAHC	35	3,02
37343	CTRPSNNTRR <b>S</b> ISI--GPGRTFFATG <b>D</b> IIGNIRQAHC	35	4,02
39775	CTRPSNNTRR <b>S</b> ISI--GPGRTFFATG <b>D</b> IIGNIRQAHC	35	4,02
42031	CTRPNNNTRK <b>G</b> IHI--GPGRAFYAMER <b>I</b> IIGDIRKAHC	35	5,18
PBC	CTRPGNNTRK <b>S</b> ITI--GPGRAFYATG <b>D</b> IIGDIRQAYC	35	2,85
<i>Transmisión parenteral</i>			
11476	CTRPNNNTRK <b>S</b> ISL--GPGRVFYTTG <b>Q</b> IVGDIRQAHC	35	4,01
15214	CTRPGNNTRR <b>S</b> IHI--GPGRAFYATG <b>D</b> IIGDIRQAHC	35	3,18
16114	CTRPNNNTR <b>Q</b> SVHI--GPGQAFYATG <b>D</b> IIGDIRRAHC	35	2,18
26157	CTRPNNNTRK <b>S</b> IHI--GPGRAFYAT- <b>N</b> IIGDIRQAHC	34	4,18
38293	CTRPNNNTRK <b>S</b> IHI--GPGRSFYATG <b>E</b> IIGDIRKAHC	35	4,18
41570	CTRPNNNTRK <b>S</b> IHI--GPGRSFYATG <b>E</b> IIGDIRKAHC	35	4,18
80013	CTRPNNNTRK <b>G</b> IHI--GPGRAFYAT- <b>D</b> IIGDIRQAYC	34	3,01
<i>Transmisión vertical</i>			
560	CERPNNNTRR <b>S</b> IHM--GFGRAFYAG- <b>D</b> IIGDIRQAHC	34	2,18
1100	CTRPNNNTRK <b>S</b> IAI--GPGRAFYTTG <b>E</b> IIGDIRQAHC	35	3,02
1295	CVRPNNNTRR <b>G</b> IHM--GPGRAFYTTG <b>E</b> IIGNIRQAHC	35	4,18
1652	CTRPNNNTRR <b>G</b> IPL--GPGKAFYTT- <b>E</b> IIGDIRKAYC	34	3,85
1892	CTRPSNNTRK <b>S</b> IQI--GPGKAFYTTG <b>D</b> IIGDIRKAHC	35	4,01
1908	CTRPNNNTRK <b>S</b> IHI--GPGRAFYATG <b>D</b> IIGNIRQAHC	35	4,18
4276	CTRPNNNTRK <b>S</b> IHI--GPGRAFYATG <b>D</b> IIGDIRQAHC	35	3,18
4880	CTRPNNNTRK <b>G</b> IHM--GPGRAFYATG <b>A</b> IIGDIRQAHC	35	4,18

En la tabla se muestran el nombre de cada virus, la secuencia, el número de aminoácidos y la carga positiva total a pH 7 de la región V3. También se han incluido los datos de los virus NL4-3 y JR-CSF. Los aminoácidos de las posiciones 11 y 25 se resaltan en negrita.

Tabla 4-6. Tropismo de los virus de los pacientes primoinfectados

	Muestra	FENOTIPO			GENOTIPO		
		GHOST P	GHOST CCR5	GHOST CXCR4	Interpr.	Carga	Interpr.
SEXUAL	7191	630 ± 120	14700 ± 1400	1120 ± 110	R5	3,85	R5
	8439	540 ± 100	27890 ± 780	1830 ± 200	R5	4,18	R5
	10573	580 ± 190	39830 ± 210	380 ± 50	R5	3,18	R5
	11525	808 ± 44	1391000 ± 69000	810 ± 62	R5	4,01	R5
	14382	777 ± 54	725000 ± 82000	640 ± 130	R5	3,18	R5
	16218	334 ± 49	60400 ± 2200	330 ± 13	R5	3,18	R5
	22652	740 ± 360	228000 ± 63000	1770 ± 120	R5	3,02	R5
	37343	656 ± 45	7780 ± 310	463 ± 16	R5	4,02	R5
	39775	990 ± 590	24700 ± 2200	1360 ± 130	R5	4,02	R5
	42031	11830 ± 240	630000 ± 30000	192000 ± 24000	R5X4	5,18	R5X4 o X4
	PBC	822 ± 10	78800 ± 6600	1940 ± 560	R5	2,85	R5
PARENTERAL	11476	5770 ± 170	339000 ± 17000	97100 ± 6800	R5X4	4,01	R5
	15214	950 ± 42	263000 ± 32000	973 ± 15	R5	3,18	R5
	16114	943 ± 5	291000 ± 42000	920 ± 33	R5	2,18	R5
	26157	537 ± 46	516000 ± 55000	1140 ± 120	R5	4,18	R5
	38293	458 ± 37	248000 ± 24000	625 ± 37	R5	4,18	R5
	41570	515 ± 22	182000 ± 17000	629 ± 66	R5	4,18	R5
	80013	985 ± 13	118000 ± 12000	972 ± 18	R5	3,01	R5
	VERTICAL	560	35 ± 3	54000 ± 3900	33 ± 5	R5	2,18
1100		40 ± 8	2500 ± 260	42 ± 4	R5	3,02	R5
1295		44 ± 4	19600 ± 1300	36 ± 3	R5	4,18	R5
1652		41 ± 5	15570 ± 910	42 ± 3	R5	3,85	R5
1892		43 ± 6	11300 ± 660	73 ± 5	R5	4,01	R5
1908		39 ± 6	16200 ± 1100	50 ± 5	R5	4,18	R5
4276		47 ± 7	46800 ± 2300	37 ± 3	R5	3,18	R5
4880		33 ± 3	33630 ± 850	42 ± 4	R5	4,18	R5

En la tabla se detallan los valores de RLU/s +/- el error de la media y la carga positiva total a pH 7 de la región V3 de los virus estudiados, junto con la interpretación (Interpr.) de los datos.

## **4.2.2 Estudio de las cepas que componen la población viral de los virus con tropismo dual, 11476 y 42031**

El carácter dual de estos aislados puede ser originado por dos mecanismos:

- La existencia en el mismo aislado de virus que entran a través del correceptor CCR5 y otros por CXCR4 (situación de mezcla).
- La existencia de una población homogénea en cuanto al uso de los correceptores (situación de tropismo ampliado).

Analizamos el tropismo de distintas variantes contenidas en la población viral de los pacientes primoinfectados que presentaron tropismo dual. Con este propósito, seleccionamos 20 clones de la envuelta, presentes en cada uno de los aislados primarios de carácter multitrópico (11476 y 42031), y estudiamos su secuencia y tropismo. Estos experimentos nos proporcionan una visión más amplia sobre el espectro de cuasiespecies de los aislados de tropismo dual.

### **4.2.2.1 Análisis genético y fenotípico de los clones de la envuelta del virus 11476**

Para determinar la relación entre las envueltas derivadas de 11476, secuenciamos la región V3C3 de cada uno de los 20 clones y comparamos las secuencias de aminoácidos y nucleótidos (Figura 4-9 A). La homología entre las secuencias aminoacídicas de las variantes fue mayor al 95% y se identificaron siete secuencias distintas (Figura 4-9 B): una compartida por dos clones, otra por tres y otra por cuatro; tres secuencias estaban representadas por un sólo clon y ocho clones compartían una secuencia en la región V3C3 idéntica a la de la población mayoritaria. Cuatro clones (7, 8, 18 y 19) presentaron mutaciones silenciosas en su secuencia de nucleótidos de la región C3. Todos los clones mostraron una carga de +4 en su región V3, a excepción de los clones 2, 5, 11 y 17 que presentaron una carga de +5 y el clon 15 con carga +3 (Tabla 4-7).

Determinamos el tropismo de varios clones del aislado 11476 y los comparamos con el de la población viral (Figura 4-9 C). Elegimos las variantes en función de su secuencia, de tal forma que estuvieran representadas la mayoría de los grupos de secuencias. Con estos clones se infectaron las células GHOST CCR5 y CXCR4 para descubrir su tropismo. Todos los clones analizados presentaron tropismo dual. El clon 15 de 11476 presentaban una mayor afinidad por el correceptor CCR5, lo que correlaciona con la predicción de su secuencia V3.

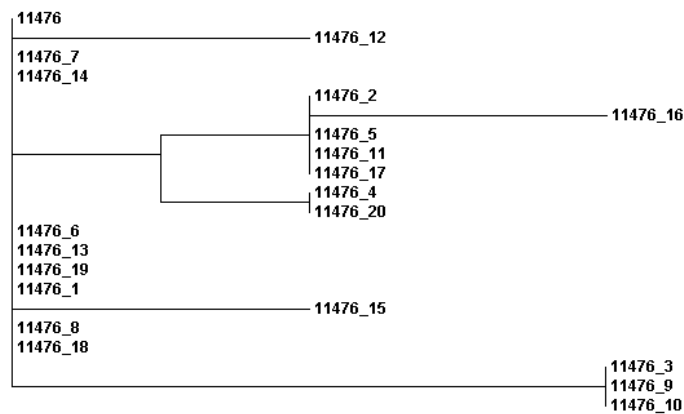
**A**

	V3					
11476	CTRPNNNTRK	SISLGPGRVF	YTTGQIVGDI	RQAHCNLSRA	KWNDTLKQIV	DKLREQFGNK
11476_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11476_2	-----	R-----	-----	-----	-----	-----
11476_3	-----	-----	S-----	-----	-----	G-----
11476_4	-----	G-----	-----	-----	-----	-----
11476_5	-----	R-----	-----	-----	-----	-----
11476_6	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11476_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11476_8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11476_9	-----	-----	S-----	-----	-----	G-----
11476_10	-----	-----	S-----	-----	-----	G-----
11476_11	-----	R-----	-----	-----	-----	-----
11476_12	Y-----	-----	-----	-----	-----	-----
11476_13	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11476_14	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11476_15	-----	-----	-----	G-----	-----	-----
11476_16	--G-----	R-----	-----	-----	-----	-----
11476_17	-----	R-----	-----	-----	-----	-----
11476_18	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11476_19	-----	-----	-----	-----	-----	-----
11476_20	-----	G-----	-----	-----	-----	-----

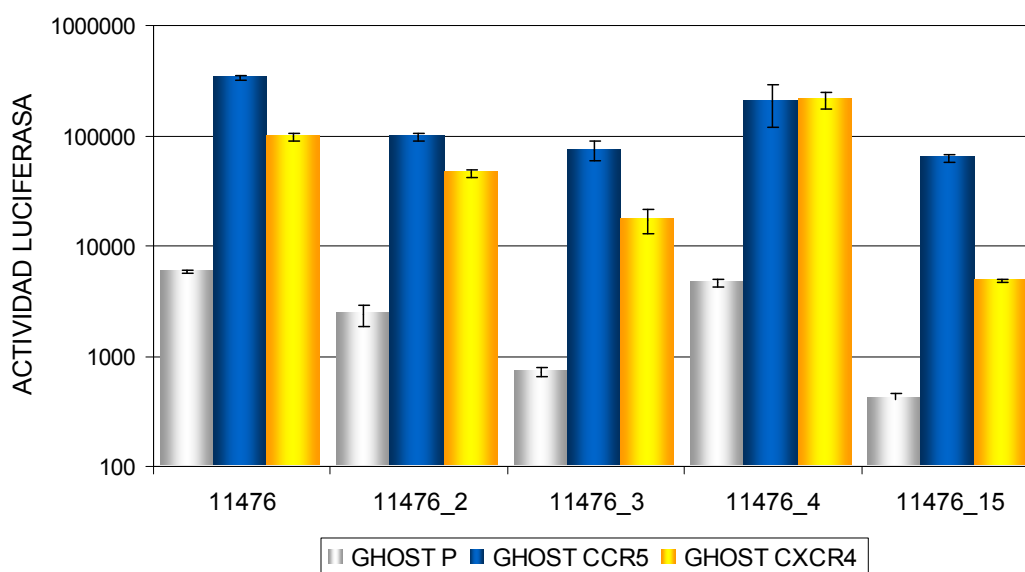
60

11476	TIVFNQSSGG	DPEITTHSFN	CGGEFFFY
11476_1	-----	-----	-----
11476_2	-----	-----	-----
11476_3	-----	-----	-----
11476_4	-----	-----	-----
11476_5	-----	-----	-----
11476_6	-----	-----	-----
11476_7	-----	-----	-----
11476_8	-----	-----	-----
11476_9	-----	-----	-----
11476_10	-----	-----	-----
11476_11	-----	-----	-----
11476_12	-----	-----	-----
11476_13	-----	-----	-----
11476_14	-----	-----	-----
11476_15	-----	-----	-----
11476_16	-----	-----	-----
11476_17	-----	-----	-----
11476_18	-----	-----	-----
11476_19	-----	-----	-----
11476_20	-----	-----	-----

**B**



C



**Figura 4-9 Análisis genético y fenotípico de los clones de la envuelta del virus 11476.** (A) Alineamiento de los aminoácidos de la región V3C3. Las secuencias se alinearon con la de la población mayoritaria del virus 11476. (B) Relación genética entre los 20 clones de la envuelta de la población del 11476, determinada en base a la secuencia aminoacídica de la región V3C3. El dendograma se generó usando el método Clustal. (C) Las células GHOST se infectaron con virus recombinantes que portan la envuelta de la población viral de tropismo dual o de los clones seleccionados. Se determinaron las unidades relativas de luz 48 horas después de la infección. Los datos representan la media de triplicados de las infecciones +/- el error de la media.

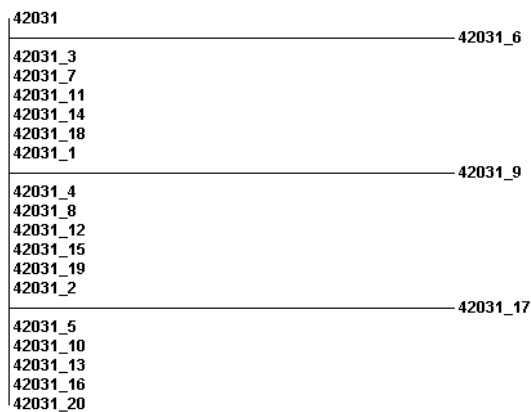
#### 4.2.2.2 Análisis genético y fenotípico de los clones de la envuelta del virus 42031

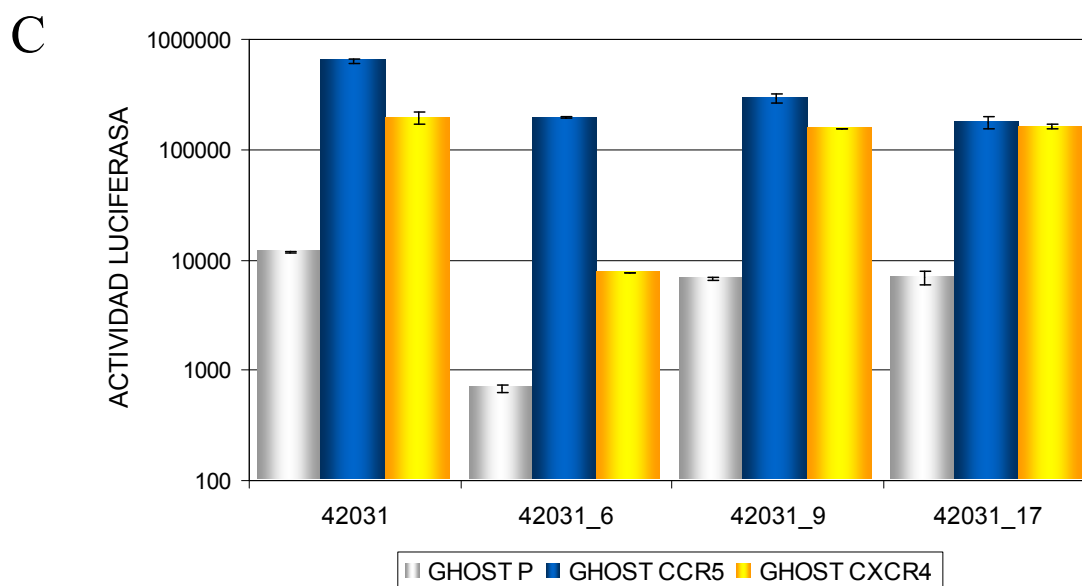
Entre los clones procedentes de la población del 42031 (Figura 4-10 A y B) sólo tres (clones 6, 9 y 17) presentaron una secuencia distinta a la de la población mayoritaria. La homología entre los clones fue superior al 97%. La región V3 del clon 6 tenía una carga de +4, menor al resto de los clones (Tabla 4-7).

Determinamos el tropismo de todas las variantes que diferían en su secuencia en la región V3C3 de la secuencia de la población mayoritaria (Figura 4-10). Todos los clones presentaron tropismo dual en las células GHOST CCR5 y CXCR4. El clon 6 de 42031 presentaba una mayor afinidad por el correceptor CCR5, lo que correlaciona con la predicción de su secuencia V3.

<b>A</b>	V3					
42031	CTRPNNNTRK	GIHIGPGRAF	YAMERIIGDI	RKAHCNISQE	HWNKTLNRIA	MKLKEQFGNK
42031_1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_5	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_6	-----	---E---	-----	-----	-----	-----
42031_7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_9	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_10	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_11	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_12	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_13	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_14	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_15	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_16	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_17	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_18	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_19	-----	-----	-----	-----	-----	-----
42031_20	-----	-----	-----	-----	-----	-----
60						
42031	TIEFKNSSGG	DPEITMHTFN	CGGEFFY			
42031_1	-----	-----	-----			
42031_2	-----	-----	-----			
42031_3	-----	-----	-----			
42031_4	-----	-----	-----			
42031_5	-----	-----	-----			
42031_6	-----	-----	-----			
42031_7	-----	-----	-----			
42031_8	-----	-----	-----			
42031_9	---D---	-----	-----			
42031_10	-----	-----	-----			
42031_11	-----	-----	-----			
42031_12	-----	-----	-----			
42031_13	-----	-----	-----			
42031_14	-----	-----	-----			
42031_15	-----	-----	-----			
42031_16	-----	-----	-----			
42031_17	-----	-----	---W---			
42031_18	-----	-----	-----			
42031_19	-----	-----	-----			
42031_20	-----	-----	-----			

**B**





**Figura 4-10 Análisis genético y fenotípico de los clones de la envuelta del virus 42031.** (A) Alineamiento de los aminoácidos de la región V3C3. Las secuencias se alinearon con la de la población mayoritaria del virus 42031. (B) Relación genética entre los 20 clones de la envuelta de la población del 42031, determinada en base a la secuencia aminoacídica de la región V3C3. El dendograma se generó usando el método Clustal. (C) Las células GHOST se infectaron con virus recombinantes que portan la envuelta de la población viral de tropismo dual o de los clones seleccionados. Se determinaron las unidades relativas de luz 48 horas después de la infección. Los datos representan la media de triplicados de las infecciones +/- el error de la media.

Por tanto, como se resume en la Tabla 4-7, el fenotipo dual de estos aislados estaría originado por la existencia de una población homogénea en cuanto al uso de correceptores, variantes R5X4, no siendo debido a una mezcla de variantes R5 y X4.

**Tabla 4-7. Tropismo de los clones de la envuelta de los virus con tropismo dual**

Muestra	FENOTIPO			GENOTIPO		
	GHOST P	GHOST CCR5	GHOST CXCR4	Interpr.	Carga	Interpr.
11476	5770 ± 170	339000 ± 17000	97100 ± 6800	R5X4	4,013	R5
11476_2	2380 ± 510	97400 ± 8400	45200 ± 3900	R5X4	5,013	X4 o R5X4
11476_3	712 ± 64	74000 ± 15000	17000 ± 4300	R5X4	4,013	R5
11476_4	4610 ± 350	203000 ± 85000	210000 ± 34000	R5X4	4,013	R5
11476_15	410 ± 47	62700 ± 4700	4810 ± 140	R5X4	3,153	R5
42031	11830 ± 240	634000 ± 29000	192000 ± 24000	R5X4	5,181	X4 o R5X4
42031_6	688 ± 56	194000 ± 18000	7640 ± 63	R5X4	4,183	R5
42031_9	6730 ± 310	295000 ± 29000	153500 ± 750	R5X4	5,181	X4 o R5X4
42031_17	6900 ± 1000	177000 ± 21000	161100 ± 7800	R5X4	5,181	X4 o R5X4

En la tabla se detallan los valores de RLU/s +/- el error de la media y la carga positiva total a pH 7 de la región V3 de los virus estudiados, junto con la interpretación de los datos.

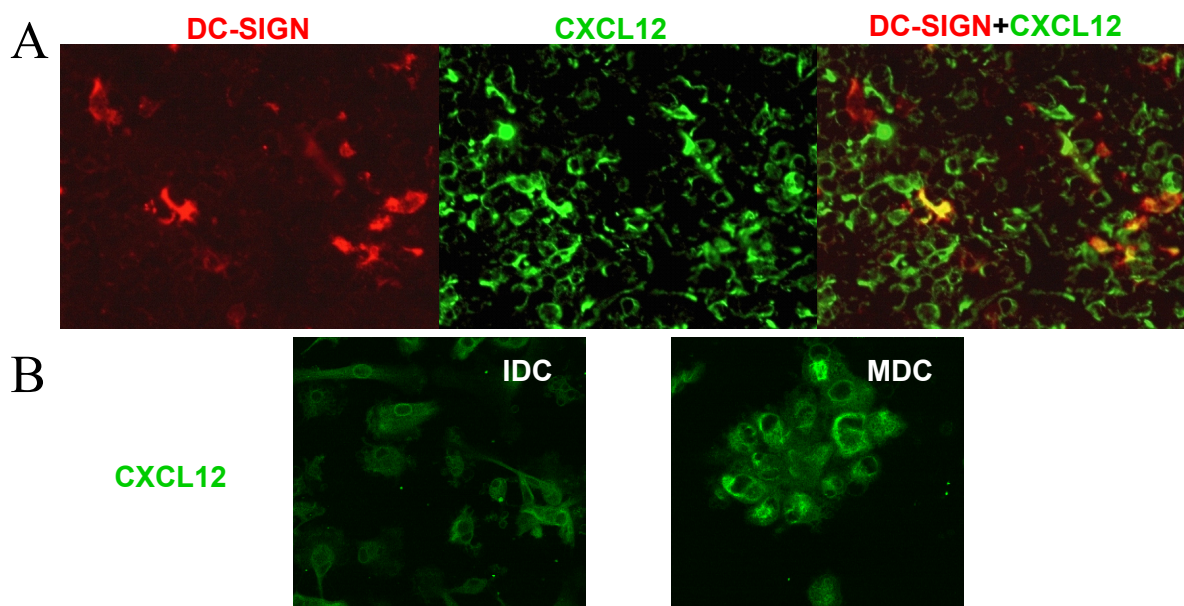
## 4.3 PROPAGACIÓN DE VIRUS R5 Y X4 EN LA SINAPSIS VIROLÓGICA

### 4.3.1 Expresión de CXCL12 en células dendríticas

Hemos observado un tropismo predominantemente de tipo R5 entre los pacientes primoinfectados por las tres vías de transmisión, tal como se describe en el apartado 4.2.1. Una hipótesis para explicar este predominio es que la producción de CXCL12 por las células dendríticas de los ganglios linfáticos podría estar implicada en el bloqueo de las cepas X4 durante la primoinfección.

Datos previos, obtenidos en nuestro laboratorio (Bermejo Herrero, 2003), mostraban la producción de CXCL12 por distintos tipos celulares en órganos linfoides. Por tanto, mediante técnicas de inmunofluorescencia analizamos la expresión de CXCL12 y DC-SIGN en células de la región paracortical del ganglio linfático (Figura 4-11 A). Detectamos un ambiente rico en CXCL12 y que muchas de las células positivas en la expresión de DC-SIGN, marcador de células dendríticas, producían CXCL12.

A partir de los datos anteriores, decidimos desarrollar un sistema *in vitro* para analizar el impacto de CXCL12 en la propagación viral en la sinapsis virológica. El primer objetivo fue definir si existe producción de CXCL12 en DC generadas *in vitro*. Al estudiar la expresión de CXCL12 en estas células (Figura 4-11 B), confirmamos la producción de CXCL12 por DC, siendo esta mayor en MDC que en IDC.



**Figura 4-11. Expresión de CXCL12 en células dendríticas.** (A) Doble marcaje con un anticuerpo frente a CXCL12 (verde) y uno frente a DC-SIGN (rojo) de células dendríticas del ganglio linfático. (B) Se muestra la expresión de CXCL12 en IDC y MDC generadas *in vitro*. Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron para CXCL12.

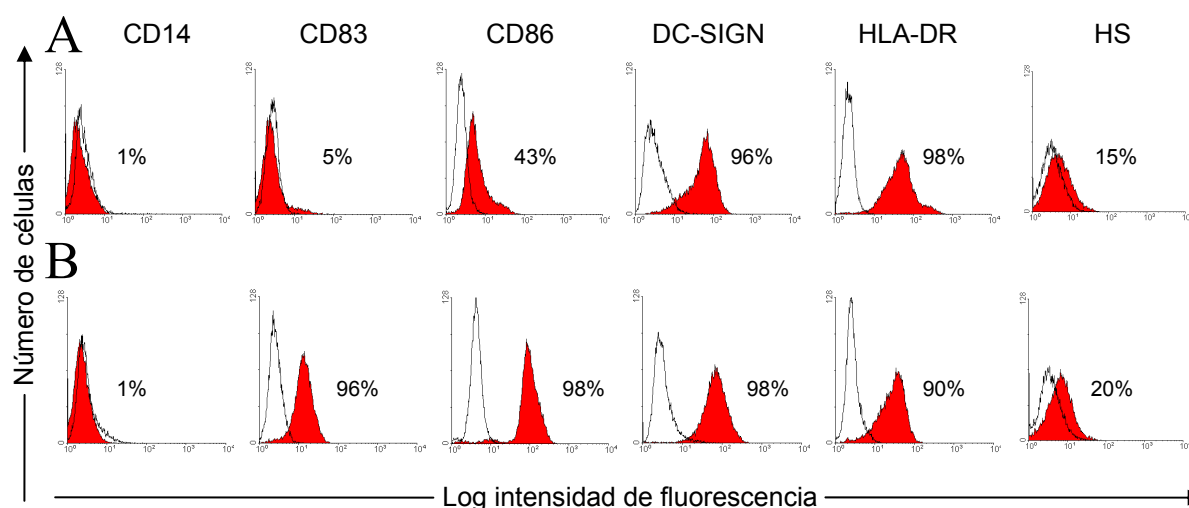


### 4.3.2 Fenotipo de las células dendríticas

El estudio de los marcadores de superficie de las células dendríticas obtenidas *in vitro* se realizó mediante citometría de flujo (Figura 4-12). El proceso de maduración de las células dendríticas se confirma por la expresión de marcadores de maduración como CD83 y el aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86. Las DC inmaduras mostraron una expresión menor de estas moléculas. Asimismo, la diferenciación de los monocitos a células dendríticas está caracterizada por la pérdida de la expresión de CD14.

La mayoría de las células dendríticas inmaduras y maduras, presentaron las moléculas DC-SIGN y HLA-DR en su superficie.

Además, las DC presentaron moléculas de heparán sulfato (HS) en su superficie, siendo esta expresión algo superior en MDC (20%) que en IDC (15%).



**Figura 4-12. Expresión de CD14, CD83, CD86, DC-SIGN, HLA-DR y HS por citometría de flujo en células dendríticas inmaduras (A) y maduras (B) generadas *in vitro*.** Para cada histograma se adquirieron un total de 10000 células. Se muestran los histogramas específicos (en rojo) y el control de isotipo (contorno negro). Se detallan los porcentajes de expresión de las distintas moléculas. Los datos corresponden a un experimento representativo de cuatro realizados.

### 4.3.3 Descripción del sistema de infección en un modelo de cultivo de linfocitos y células dendríticas autólogas

Para analizar el papel de las células dendríticas en la propagación de las cepas R5 y X4 del VIH-1, las DC, diferenciadas durante 7 días, se incubaron durante 2 horas con un virus R5 (JR-CSF) o X4 (NL4-3), que codifica un marcador luciferasa. Tras la adsorción, se realizaron seis lavados para eliminar las partículas virales libres y posteriormente, se cultivaron las DC con linfocitos T autólogos activados con PHA e IL-2. Como controles, se

infectaron tanto linfocitos T activados como células dendríticas maduras, ambos con la misma dosis de virus y bajo las mismas condiciones. Se midió la actividad luciferasa en los diferentes cultivos 48 horas más tarde (Figura 4-13).

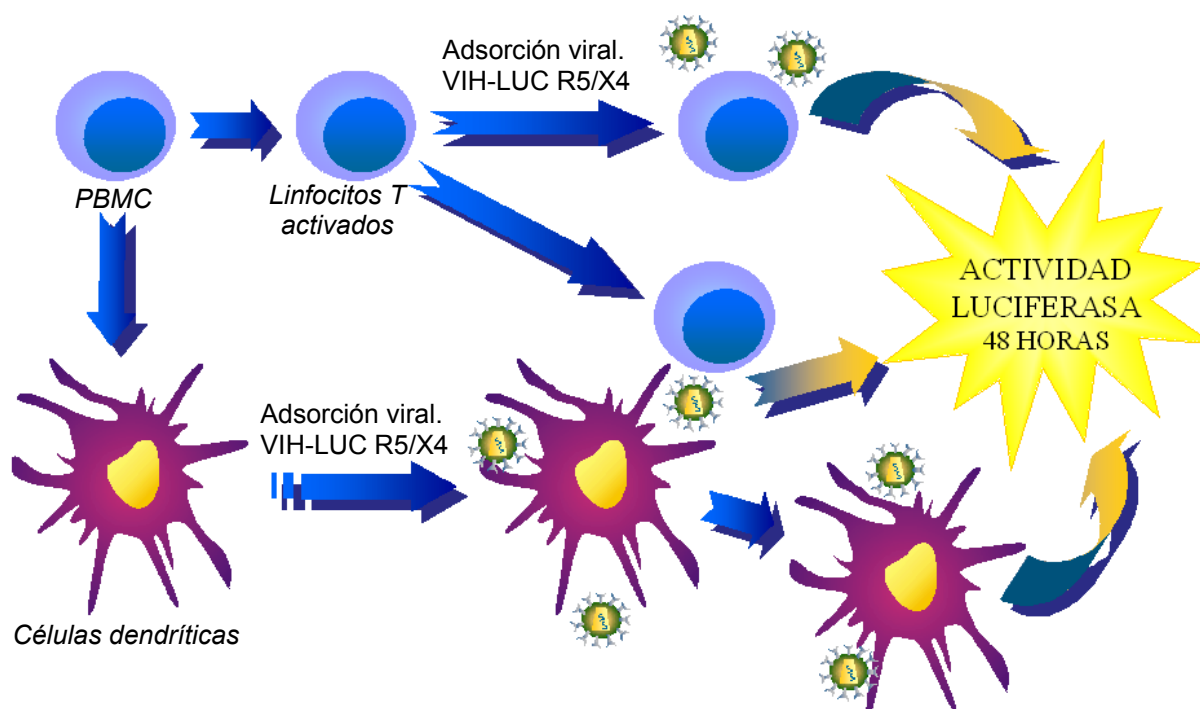


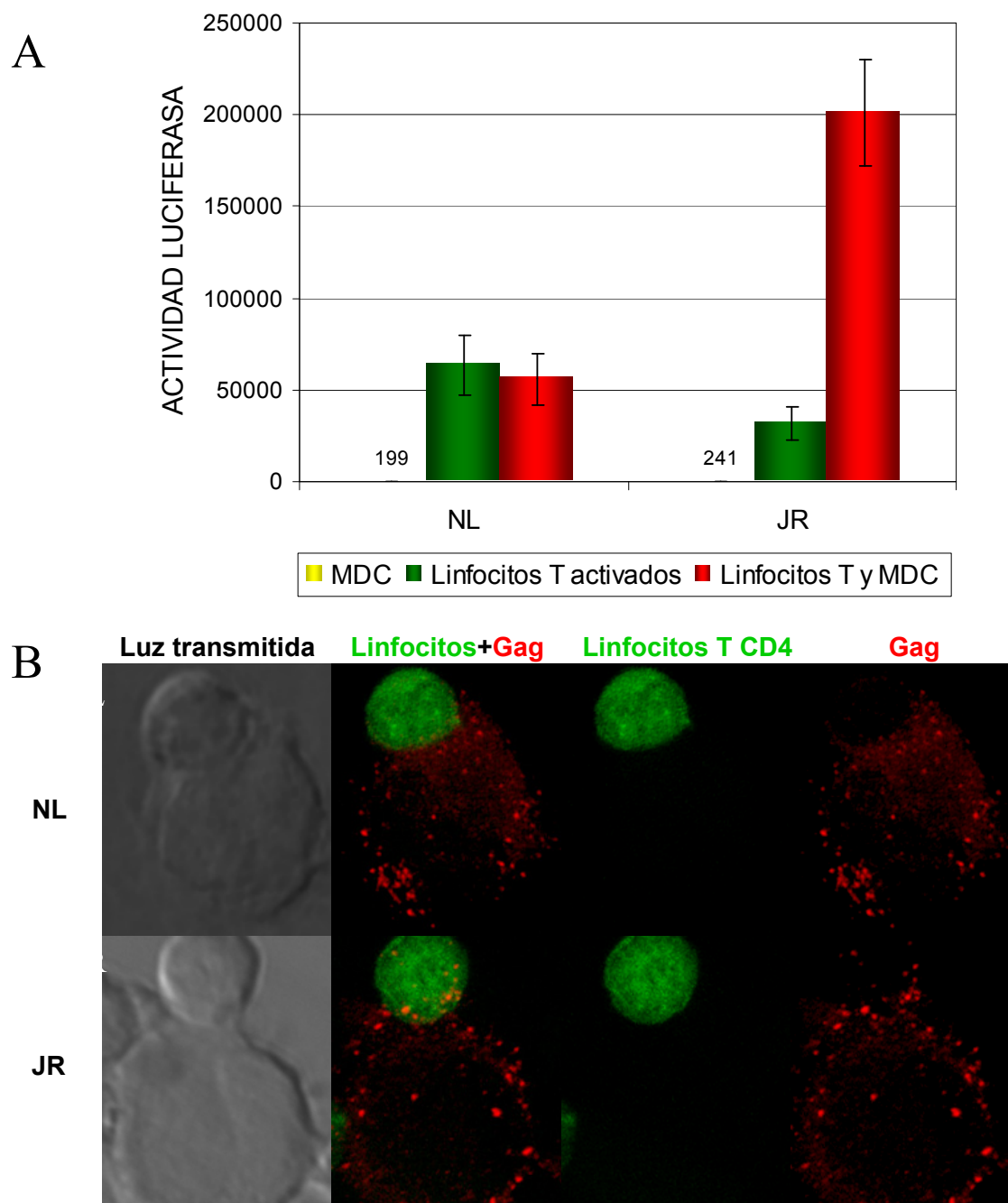
Figura 4-13. Dibujo explicativo del modelo de infección descrito

#### 4.3.4 Facilitación de la propagación a linfocitos de virus R5 pero no X4 por MDC en la sinapsis virológica

Se llevaron a cabo experimentos de infección *in vitro* siguiendo el procedimiento descrito en el modelo de la Figura 4-13 y en el capítulo de Material y Métodos. En dichos experimentos, la infección con una cepa R5 del VIH se incrementó en una media de siete veces (de  $3 \times 10^4$  a  $2 \times 10^5$  RLU/s) cuando los linfocitos se cultivaron con células dendríticas autólogas, previamente incubadas con el virus JRRen, en comparación con la infección directa de los linfocitos activados (Figura 4-14 A). En cambio, cuando se utilizó una cepa X4 (virus NL4-3Ren) no se produjo una facilitación de la infección por las células dendríticas.

No se detectó actividad luciferasa en los cultivos aislados de MDC, lo que indica que las MDC no se infectan de forma productiva bajo estas condiciones.

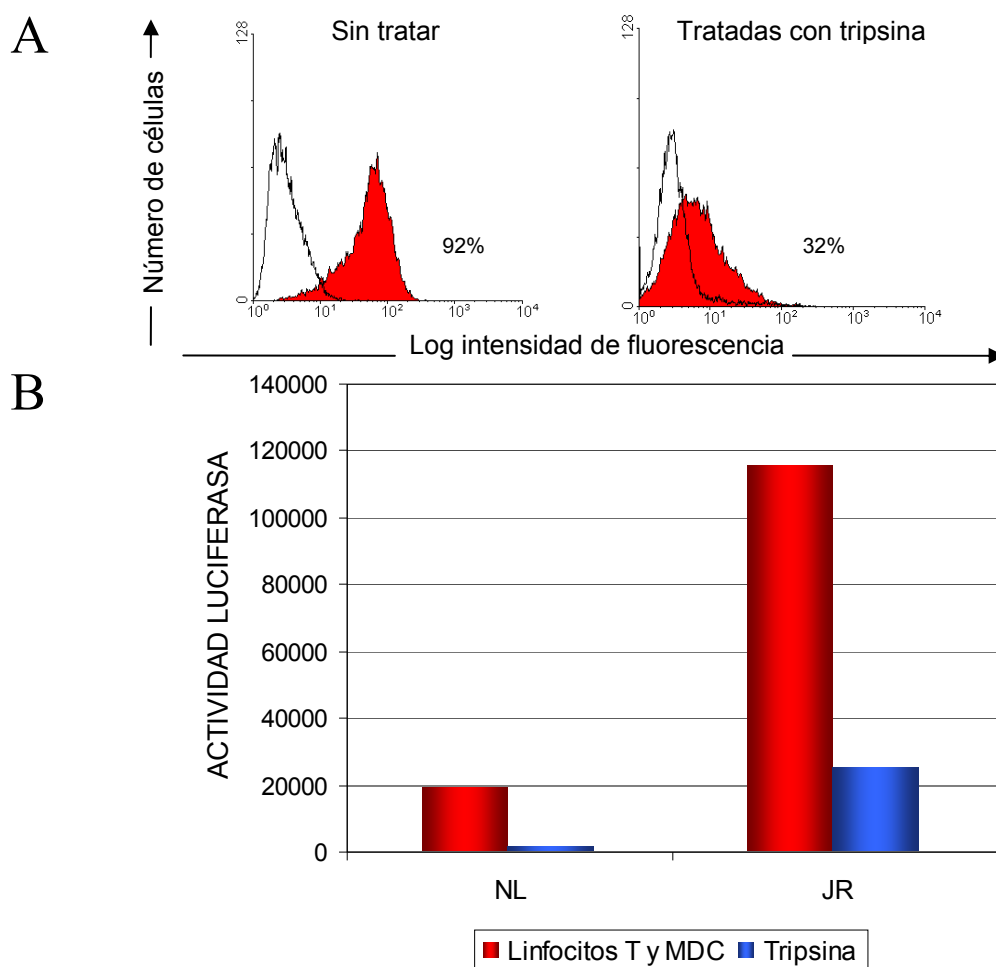
Además, los conjugados formados entre las MDC, incubadas con el virus NL4-3Ren o JRRen, y las células T CD4 se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con anticuerpos monoclonales específicos frente a Gag y se analizaron por microscopía confocal (Figura 4-14 B). En este caso, se puede apreciar una mayor transferencia de los virus R5 (JRRen), frente a los X4, desde las MDC a los linfocitos T CD4.



**Figura 4-14. MDC incrementan la infección de los virus R5 pero no la de los X4. (A)** Las MDC se incubaron con el virus NL4-3Ren o JRRen (barras amarillas y valores RLU/s). Los linfocitos se activaron con PHA e IL-2 durante siete días y se infectaron con el virus NL4-3Ren o JRRen (barras verdes). Las MDC se incubaron con el virus NL4-3Ren o JRRen, se lavaron con PBS y cultivaron con linfocitos activados (barras rojas). Las células se recogieron 48 horas después de la infección, se lisaron y se midió la actividad luciferasa. La figura muestra la media de quince experimentos  $\pm$  el error de la media. **(B)** En la figura aparece un conjugado formado entre una célula dendrítica (debajo) y un linfocito T (arriba) marcados con un anticuerpo frente a Gag (rojo). Las células T CD4, enriquecidas negativamente a partir de PBMC mediante separación magnética, se marcaron con fluorescencia verde. A la izquierda se exponen las imágenes de luz transmitida de las mismas células. La intensidad del láser y la ganancia se ajustaron para que el control isotópico no diera ninguna señal en los canales de fluorescencia verde y roja. Se muestra una reconstrucción tridimensional de las imágenes.

#### 4.3.5 El tratamiento con tripsina provoca una reducción en la transmisión del VIH-1 a los linfocitos por MDC

La tripsina digiere de una manera inespecífica las proteínas presentes en la superficie celular, entre ellas, DC-SIGN. Las MDC, previamente incubadas durante 2 horas con el virus NL4-3Ren o JRRen, se trataron con tripsina, tras la adsorción viral, durante 10 minutos. Para controlar la eficacia de la digestión proteica, se analizó por citometría de flujo la expresión de DC-SIGN en la superficie de las MDC. Dicha expresión disminuyó de un 92% a un 32% después del tratamiento con tripsina (Figura 4-15 A). Tras el tratamiento con la proteasa, las células se cultivaron con linfocitos T activados y se realizaron los ensayos como se describe previamente. En las MDC tratadas con tripsina se redujo significativamente la transmisión viral a los linfocitos (Figura 4-15 B), lo que sugiere que en nuestro modelo la transmisión del VIH se produce esencialmente por el virus que se une a DC-SIGN en la superficie celular.



**Figura 4-15. El tratamiento con tripsina inhibe la transmisión viral de MDC a linfocitos.** (A) Expresión de DC-SIGN en MDC antes y después del tratamiento con tripsina. (B) Las MDC se trataron con tripsina al 0,1% durante 10 minutos (barras azules) o se mantuvieron en medio RPMI (barras rojas), antes de añadir las células diana. La infección se determinó midiendo la actividad luciferasa a las 48 horas en un luminómetro. Los datos corresponden a un experimento representativo de tres realizados.

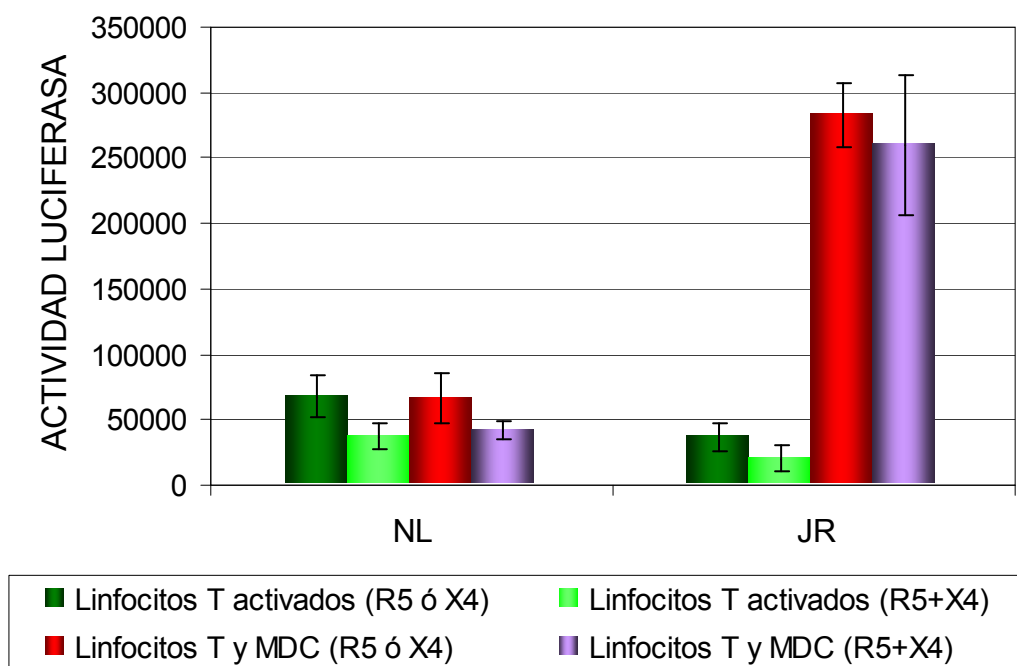
#### **4.3.6 Experimentos de competición entre virus de tropismo R5 y X4**

Para analizar una potencial competición o sinergia en la infección entre virus R5 y X4 y simular unas condiciones más realistas en las cuales el sujeto se ve expuesto a una mezcla de virus, infectamos las células con una mezcla de virus de tropismo R5 y X4. Para discriminar entre la infección producida por uno y otro virus, utilizamos virus con distintos marcadores luciferasa (NL4-3Ren y JRLuc; NL4-3Luc y JRRen). Las MDC se incubaron con las mezclas de virus, se realizaron seis lavados y, posteriormente, se cultivaron con linfocitos T activados. Como control, se infectaron directamente linfocitos T activados con la mezclas de virus bajo las mismas condiciones. Se midió la actividad luciferasa en los diferentes cultivos 48 horas más tarde.

Simultáneamente a estas infecciones dobles, se midió la actividad luciferasa en cultivos de células infectadas con cada virus por separado, siguiendo exactamente el mismo procedimiento que en el apartado 4.3.4.

El resultado fue muy similar cuando los linfocitos se infectaron con una mezcla de ambos virus (Figura 4-16). La infección con una cepa R5 del VIH también se incrementó cuando los linfocitos se cultivaron con MDC autólogas en presencia de un virus X4. Mientras que en el caso contrario, la infección con el NL4-3 no aumentó.

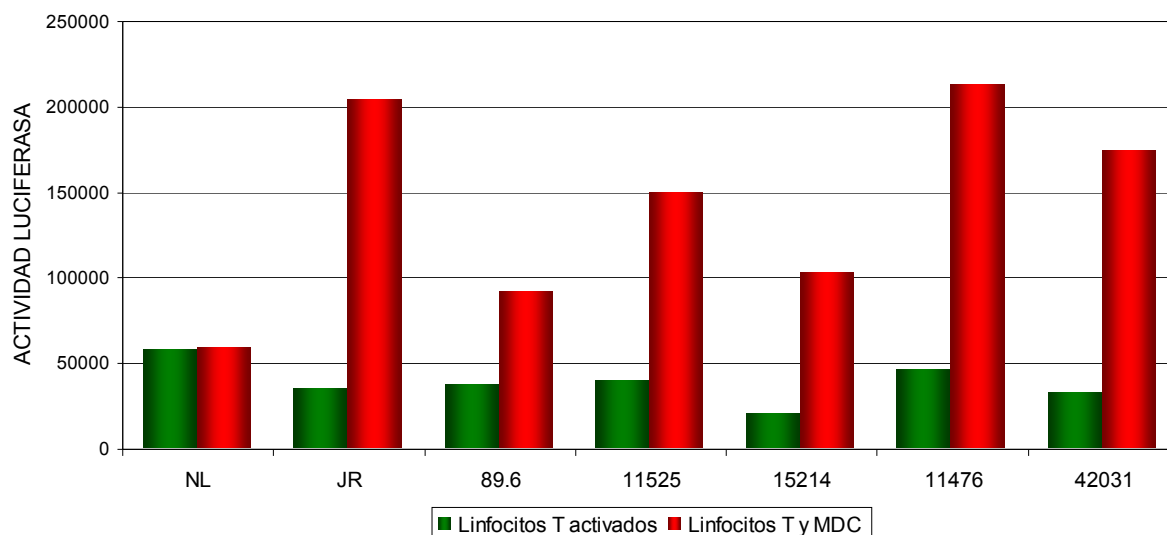
Deducimos que, en las condiciones experimentales descritas, los dos virus se comportan de manera independiente: no compiten entre sí, ni hay sinergia en la infección cuando virus de ambos tropismos están presentes.



**Figura 4-16. Experimentos de competición entre virus R5 y X4.** En esta gráfica, las barras de color verde oscuro y rojo muestran los valores RLU/s en células mono-infectadas. Las barras de color verde claro y violeta muestran los valores cuando un virus de tropismo X4 (NL) y otro R5 (JR), cada uno con un marcador luciferasa diferente, se usaron en los experimentos de infecciones dobles. La figura muestra la media de cuatro experimentos +/- el error de la media.

#### 4.3.7 Facilitación de la propagación a linfocitos de virus R5 y R5X4 de pacientes por MDC en la sinapsis virológica

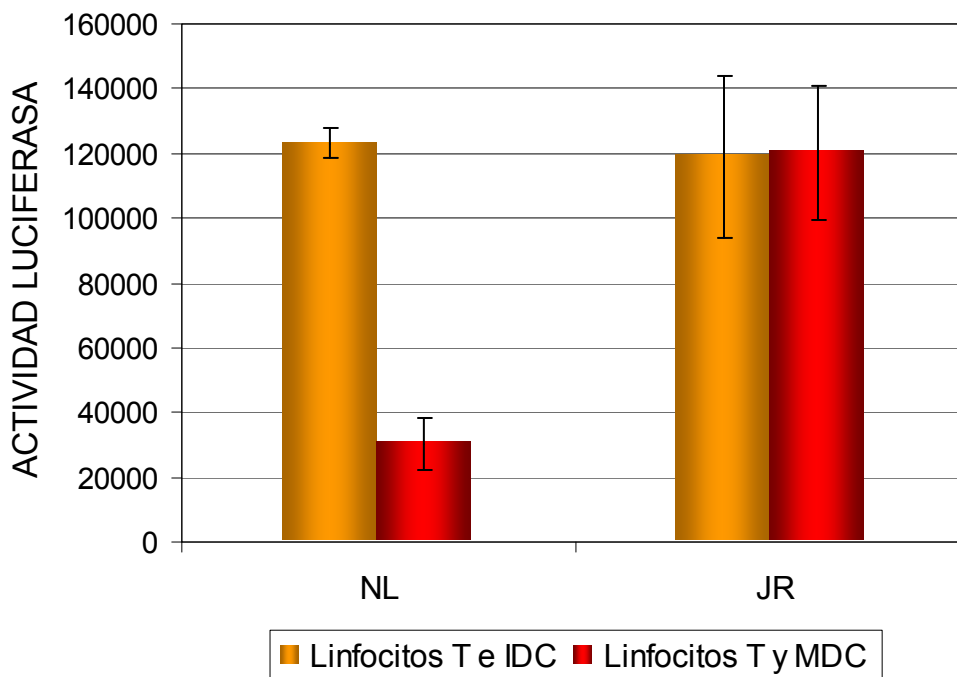
Para confirmar estos resultados en virus recombinantes generados a partir de muestras de pacientes y analizar el comportamiento de virus de tropismo dual, las MDC se incubaron con virus recombinantes con envueltas procedentes de la población viral de pacientes en el estadio de la primoinfección y con el virus de referencia 89.6Ren. Seleccionamos dos virus de tropismo R5 (11525Ren y 15214Ren) y dos de tropismo dual (11476Ren y 42031Ren) entre los de pacientes primoinfectados y realizamos infecciones en el sistema de cultivo de linfocitos con MDC autólogas. El perfil mostrado por la infección con los virus de tropismo R5X4 fue muy similar al que presentaban los virus de tropismo R5. Las MDC incrementaron la replicación del VIH en los linfocitos, lo que indica que estos virus de tropismo dual utilizan preferentemente el correceptor CCR5 en la sinapsis virológica.



**Figura 4-17. MDC incrementan la infección de virus R5 y R5X4 de pacientes.** Los linfocitos se activaron con PHA e IL-2 durante siete días y se infectaron con los distintos virus recombinantes (barras verdes). Las MDC se incubaron con los virus recombinantes, se lavaron con PBS, para eliminar el virus no unido, y cultivaron con linfocitos T activados (barras rojas). Las células se recogieron 48 horas después de la infección, se lisaron y se midió la actividad luciferasa. La gráfica es representativa de tres experimentos.

#### 4.3.8 Facilitación de la propagación a linfocitos de virus X4 por IDC pero no por MDC en la sinapsis virológica

Como habíamos detectado una mayor producción de CXCL12 por las MDC que por las IDC (Figura 4-11), cultivamos los linfocitos con IDC o con MDC autólogas incubadas con NL4-3Ren o JRRen. Al igual que en experimentos anteriores, cuando los linfocitos se cultivaron con MDC incubadas con un virus X4, no se observó el incremento de la infección que se produce en el caso del virus R5 (Figura 4-18). En cambio, no observamos una disminución en el incremento de la infección del virus X4 cuando los linfocitos se cultivaron con IDC. Estos datos sugieren que la quimiocina CXCL12 producida por las MDC está interfiriendo con la transmisión de las cepas X4.



**Figura 4-18. La transmisión de las cepas X4 desde IDC a linfocitos es mayor que desde MDC.** La infección de linfocitos cultivados con IDC está representada con barras de color naranja y las barras rojas corresponden a la infección de linfocitos cultivados con MDC. La figura muestra la media de tres experimentos +/- el error de la media.

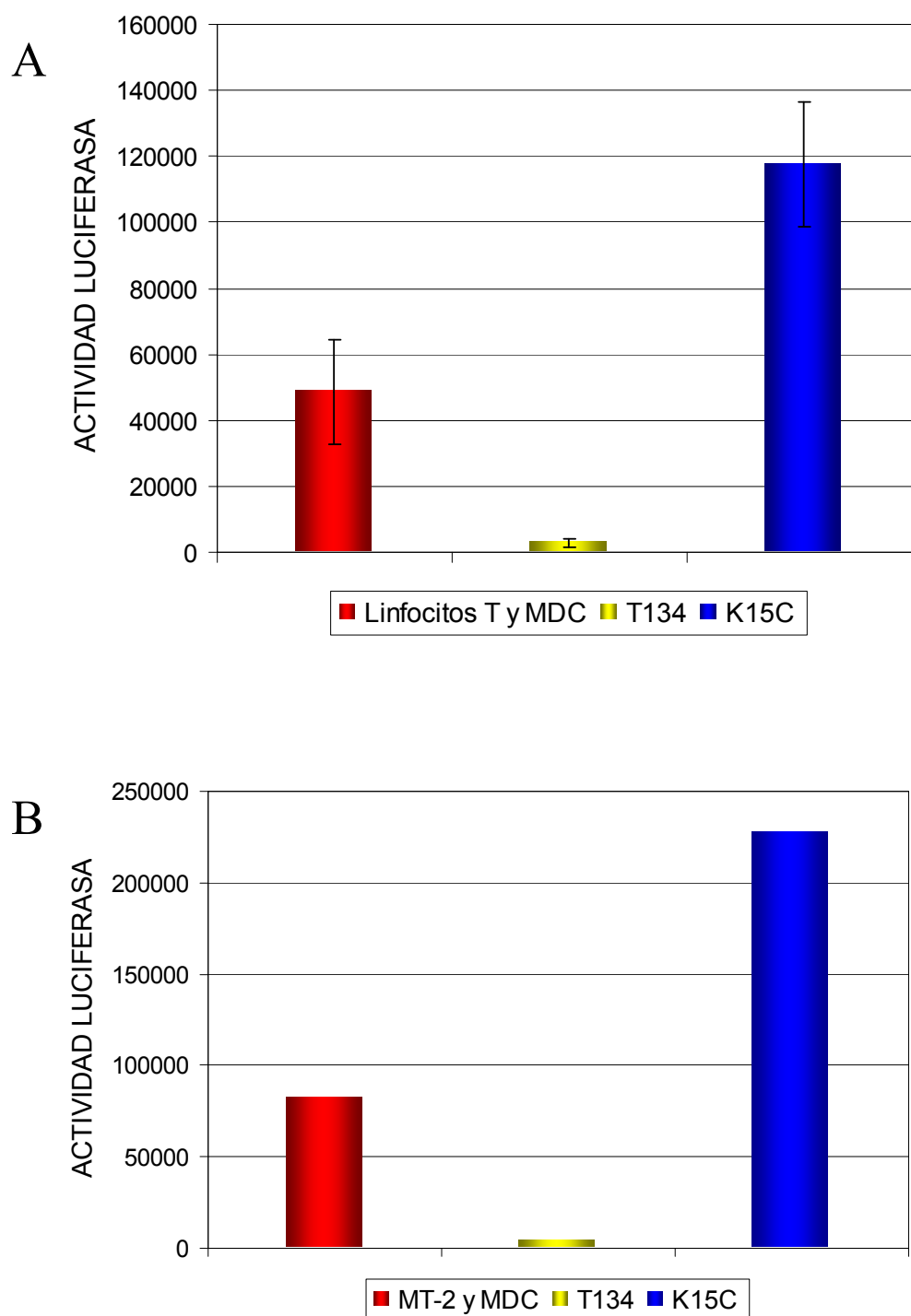
#### **4.3.9 El anticuerpo anti-CXCL12, K15C, incrementa la infección por las cepas X4 del VIH-1 en un modelo de cultivo de linfocitos y células dendríticas autólogas**

Si es correcta la hipótesis de que la producción de CXCL12 por MDC está implicada en la propagación de las variantes X4 en la sinapsis virológica, el bloqueo de esta quimiocina incrementará la infección de los linfocitos por variantes X4 en dicho entorno.

Con este fin, las MDC, incubadas con el VIH-1, se trataron con anticuerpos contra CXCL12, antes de la adición de los linfocitos. Como se observa en la Figura 4-19, el uso del anticuerpo neutralizante, K15C, aumentó la infección con los virus X4 en un factor 2,4. Estos datos indican que la inhibición de la infección de los virus X4, en nuestro modelo de cultivo de linfocitos T con MDC autólogas es, al menos en parte, debido a la producción de CXCL12.

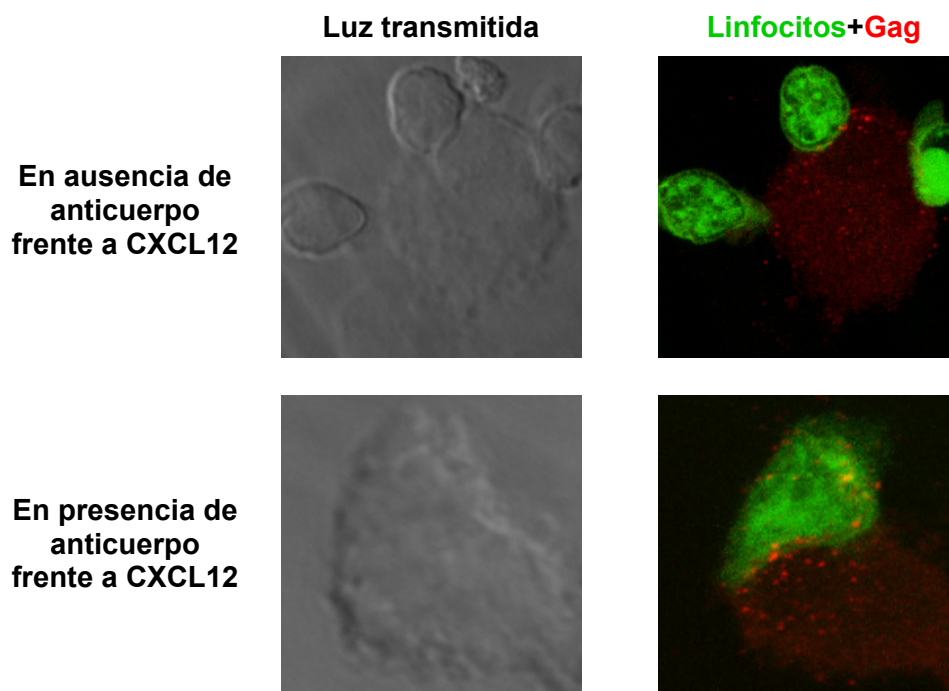
Para verificar este resultado en otro tipo celular, después de lavar para eliminar el virus no unido, las MDC se cultivaron con células MT-2, permisivas a la infección por las cepas X4 del VIH-1. En estos experimentos, después de haberse añadido el anticuerpo K15C, la infección se incrementó en tres veces cuando se compara con la de las células sin anticuerpo neutralizante.





**Figura 4-19. El bloqueo del efecto de CXCL12, con el anticuerpo K15C, incrementa la infección con cepas X4 del VIH.** MDC se incubaron durante 2 horas con la cepa NL4-3Ren y las partículas virales no unidas a la membrana se retiraron mediante lavados. Posteriormente, el cultivo de MDC se incubó con el anticuerpo neutralizante K15C (barras azules) o con un control de isotipo (barras rojas) y, finalmente, se añadieron linfocitos activados (media de 3 experimentos) (**A**) o células MT-2 (**B**). La infección se inhibió totalmente cuando las células se trataron con el inhibidor específico para CXCR4, T134 (barras amarillas).

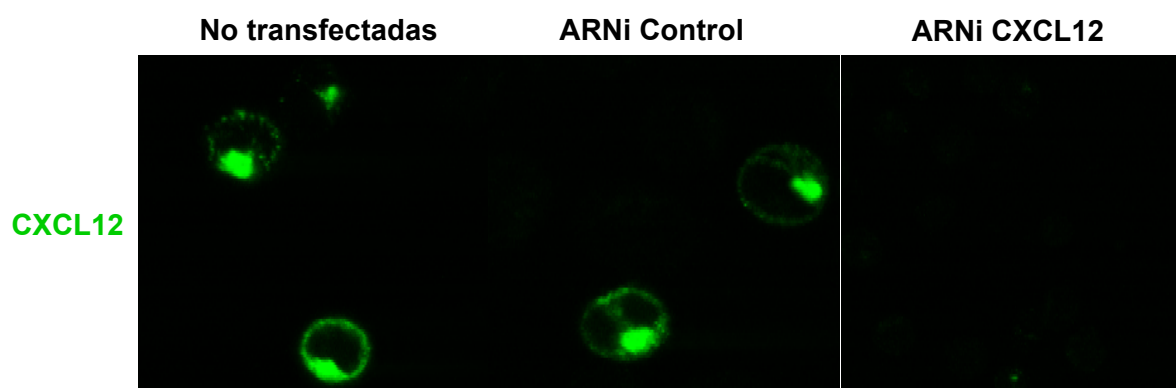
El efecto del bloqueo de CXCL12 en la propagación de un virus X4 también se analizó por microscopía confocal. Para ello, comparamos la localización de Gag en conjugados tratados con K15C frente a no tratados. Cuando se añadió el anticuerpo frente a CXCL12, se detectó la proteína Gag del VIH en las células T conjugadas, demostrándose así la facilitación de la transferencia viral por la célula dendrítica cuando CXCL12 es neutralizado.



**Figura 4-20. El bloqueo de CXCL12 aumenta la transferencia de las cepas X4 desde las MDC a los linfocitos autólogos.** Los conjugados entre MDC incubadas con el virus NL4-3Ren y células T CD4 se formaron en ausencia o presencia del anticuerpo neutralizante frente a CXCL12. Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron para Gag (rojo). Las células T CD4 se premarcaron con un marcador citoplasmático (verde).

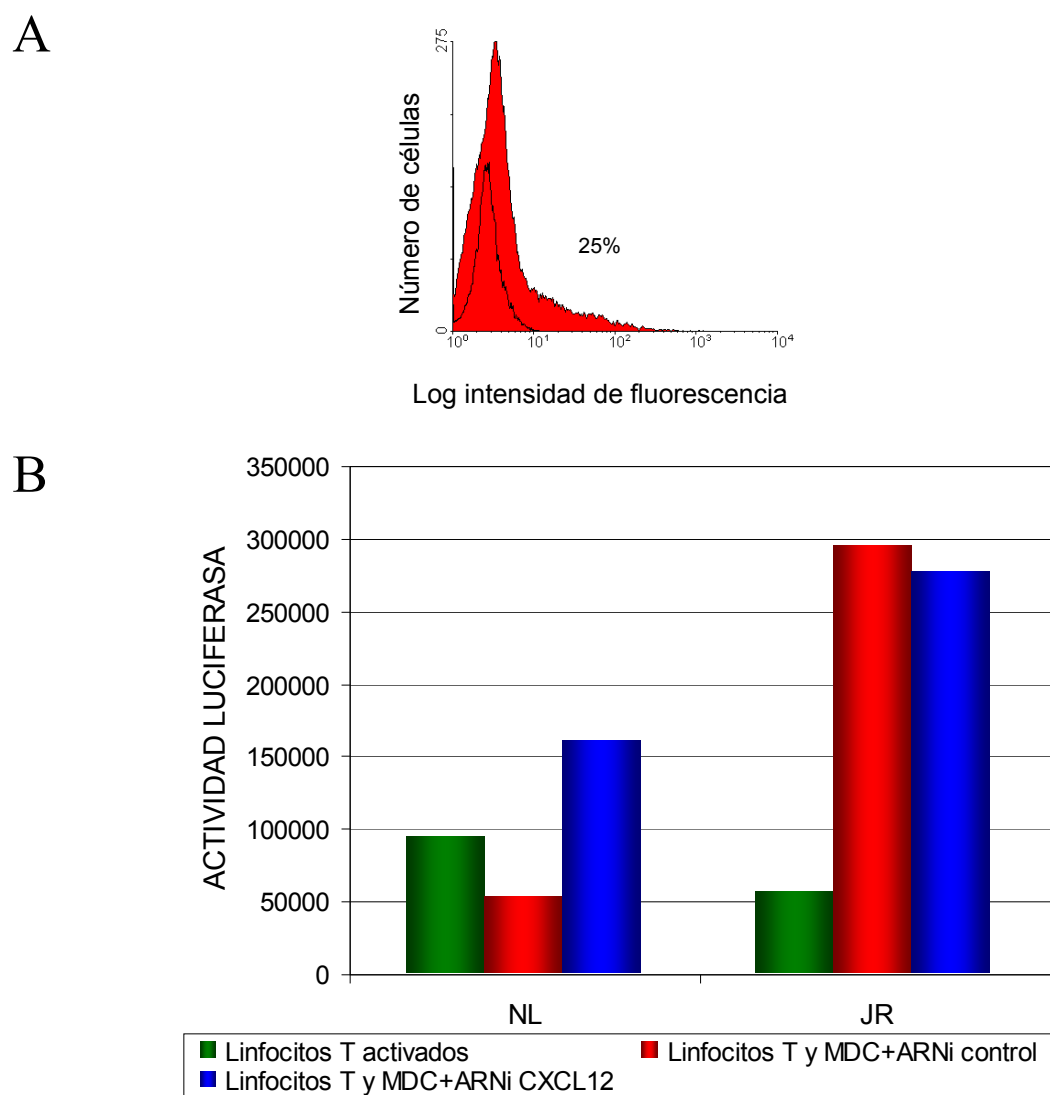
#### **4.3.10 El ARN de interferencia dirigido contra el gen CXCL12 incrementa la infección por las cepas X4 del VIH-1 en un modelo de cultivo de linfocitos y células dendríticas autólogas**

Para confirmar el impacto de CXCL12 en la propagación de variantes X4, bloqueamos la producción de la quimiocina mediante ARNi en MDC. Se diseñaron ARNi dirigidos contra distintas regiones del gen CXCL12. La capacidad de los ARNi para inhibir la expresión de CXCL12 se valoró transfectando células Jurkat con un plásmido control (pSUPER-siGFP) o con las construcciones pSUPER-siCXCL12 junto con un vector de expresión de CXCL12. Las células se marcaron con un anticuerpo frente a CXCL12 y la expresión de la proteína se analizó por técnicas de inmunofluorescencia (Figura 4-21).



**Figura 4-21. Análisis de la eficacia de los ARNi en la inhibición de la expresión de CXCL12.** Expresión de CXCL12 en células Jurkat sin transfectar, transfectadas con un ARNi control o con los ARNi dirigidos contra el gen CXCL12. Las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron para CXCL12 (verde).

Con el propósito de silenciar la expresión del gen CXCL12 en las MDC, estas células se transfectaron con la mezcla de ARNi. La eficiencia de transfección de las MDC fue del 25% (Figura 4-22 A) y se determinó transfectando en paralelo estas células con el plásmido pmaxGFP<sup>TM</sup> y analizándolas por citometría de flujo. Las MDC transfectadas con la mezcla de ARNi frente a CXCL12 facilitaron la propagación del virus NL4-3Ren a los linfocitos más eficientemente (en un factor 3) que las MDC transfectadas con un ARNi control. Los ARNi dirigidos frente a CXCL12 no tuvieron efecto sobre la infección con el virus JRRen (Figura 4-22 B). Estos datos confirman que la proteína CXCL12 producida por MDC está interfiriendo en la transmisión de las cepas X4 en la sinapsis virológica.

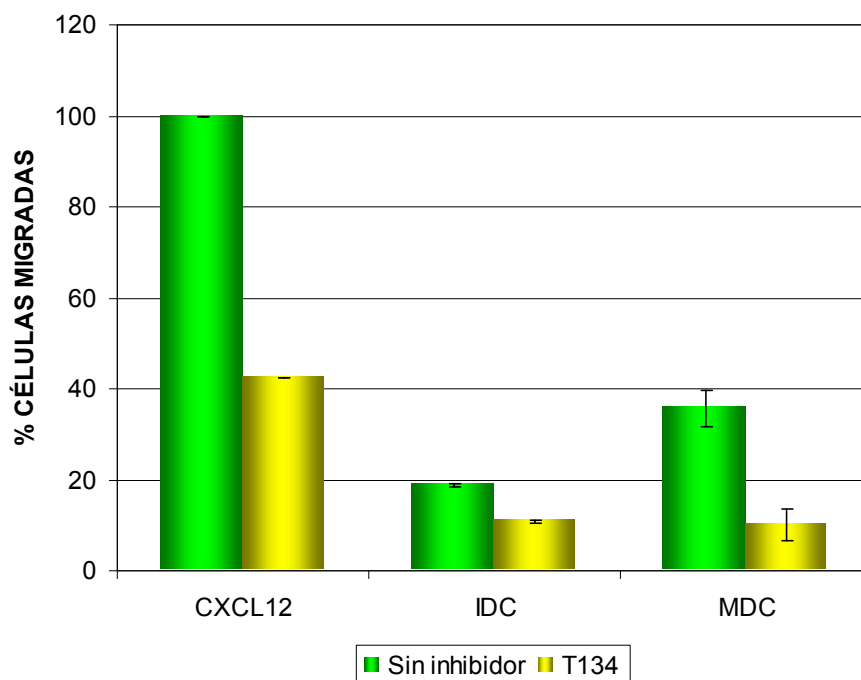


**Figura 4-22. El bloqueo del efecto de CXCL12 con ARNi incrementa la infección con cepas X4 del VIH. (A)** Eficiencia de la transfección de las MDC con el plásmido pmaxGFP. **(B)** Las MDC se transfectaron con un ARNi control (barras rojas) o con los ARNi contra CXCL12 (barras azules), posteriormente se incubaron con el NL4-3Ren o el JRRen y, finalmente, se añadieron los linfocitos al cocultivo. La infección directa de los linfocitos con se representa con barras verdes. Los resultados son representativos de tres experimentos.

#### 4.3.11 La proteína CXCL12 presente en los sobrenadantes del sistema de infección *in vitro* muestra actividad quimiotáctica

Los ensayos de migración de células a través de una membrana, permiten evaluar la capacidad quimiotáctica de una sustancia. Para verificar que la proteína CXCL12 expresada por las DC es biológicamente activa, se realizaron ensayos de migración de PBMC, a través de membranas de policarbonato, en respuesta a sobrenadantes de IDC o MDC. Dichos sobrenadantes consistían en el medio de cultivo de los linfocitos infectados con el virus NL4-

3, cultivados con IDC o con MDC autólogas. Como se muestra en la Figura 4-23, el número de células atraídas por los sobrenadantes de MDC fue mayor que por los sobrenadantes de IDC. Este efecto es parcialmente neutralizado cuando se añade el inhibidor específico de CXCR4, T134.



**Figura 4-23. Migración de PBMC en respuesta a CXCL12 y a sobrenadantes de los experimentos de infección.** Se estudió la migración de PBMC inducida por la quimiocina CXCL12 (200 nM) o por los sobrenadantes de los experimentos de infección (barras verdes). La especificidad de la migración dependiente de CXCL12/CXCR4 se midió incubando las células con el péptido T134 (barras amarillas). Para determinar la migración no específica, se usaron como controles 2 pocillos que no contenían ninguna quimiocina, y a cada valor de células migradas se le restó el de las células migradas de manera espontánea. Se consideró el porcentaje de células que migraron inducidas por una concentración 200 nM de CXCL12 como el porcentaje de migración máxima. Los datos mostrados son la media de dos experimentos independientes +/- el error de la media.

---

## 5 DISCUSIÓN

---

La envuelta del VIH-1 a lo largo de la infección sufre una serie de modificaciones que le permiten el escape a la neutralización por los anticuerpos y una mejor adaptación a sus receptores. La envuelta del VIH-1 adopta una conformación que le permite la evasión de la respuesta inmune mediada por anticuerpos neutralizantes. En su forma nativa, la envuelta del VIH-1 posee una estructura en la que la parte expuesta corresponde a regiones variables de la molécula, mientras que los dominios de unión a los receptores se encuentran ocultos. Estos dominios únicamente quedan expuestos, debido a una serie de cambios conformacionales, en el momento de interacción entre las membranas celular y viral (Wyatt y Sodroski, 1998). En este contexto, se produce una disminución en la eficacia de los anticuerpos provocada por la baja accesibilidad a los epítomos de neutralización. Por otra parte, los cambios en la envuelta que incrementan la avidéz por los receptores aumentan la capacidad del VIH-1 para inducir apoptosis tras la infección viral (Holm y col., 2004). A través de este mecanismo, los virus aumentarían su virulencia y capacidad citopática.

Además, la evolución de virus con tropismo R5 a variantes que utilizan el correceptor CXCR4 en alrededor del 50% de los pacientes (Schuitemaker y col., 1992) pone de manifiesto la capacidad del VIH-1 para cambiar de correceptor *in vivo*. La emergencia de cepas X4 o con tropismo dual correlaciona con una disminución en el número de linfocitos CD4 y progresión a SIDA (Tersmette y col., 1989). Se desconocen los mecanismos implicados en el cambio de tropismo viral y en la distinta capacidad patogénica entre variantes R5 y X4. Aunque se ha sugerido que los virus X4 producen un mayor efecto citopático debido a la mayor expresión del correceptor CXCR4 en tejido linfoide (Grivel y Margolis, 1999).

Además de incrementar la avidéz por sus receptores o el escape a la neutralización por anticuerpos, el VIH también emplea otras estrategias para aumentar su capacidad infectiva. Las células dendríticas pueden capturar el VIH a través de lectinas de tipo C para posteriormente transmitirlo a una célula diana (Geijtenbeek y col., 2000b). Esta transmisión directa de célula a célula aumenta la infectividad y la propagación viral. En esta tesis se propone que las células dendríticas están involucradas, no sólo en la facilitación de la

infección a los linfocitos CD4 en la sinapsis virológica, sino en la transmisión preferente de virus de tropismo R5 inhibiendo la propagación de variantes X4.

Actualmente se están desarrollando inhibidores de la entrada viral. En concreto, se ha centrado la atención en los antagonistas de CCR5 por su papel en la transmisión y diseminación del VIH en el curso de la infección.

Todo lo expuesto anteriormente muestra la importancia de estudiar los factores de virulencia del VIH, muchos de los cuales dependen de la estructura y cambios en su envuelta, y de elucidar los mecanismos moleculares que gobiernan estos procesos. En este trabajo, se desarrollan sistemas que permiten el estudio de la biología de la envuelta viral así como del tropismo del VIH-1. La tecnología desarrollada se utiliza para abordar algunos aspectos mal comprendidos de la transmisión del VIH-1 y de la evolución del tropismo viral *in vivo*.

## 5.1 EVALUACIÓN DEL TROPISMO DEL VIH-1

El estudio del tropismo viral posee gran interés a causa de las diferentes características que presentan los virus dependiendo del correceptor que utilicen para su entrada en la célula. Tal como se ha señalado en el apartado anterior, las cepas X4 se caracterizan por un alto grado de patogenicidad, asociado a una mala evolución de la enfermedad, mientras que las R5 destacan por ser más transmisibles.

En los últimos años, se están desarrollando nuevos fármacos dirigidos frente a los correceptores del VIH-1. Para evaluar estos inhibidores de los correceptores, al igual que para el estudio de los inhibidores de la entrada viral, es crítico el desarrollo de métodos que permitan la caracterización del tropismo del VIH. Este tipo de métodos permiten seleccionar los pacientes que entrarán a formar parte de los ensayos clínicos basándose en el uso por el correceptor de sus variantes virales, así como, detectar si ocurre un cambio de tropismo después de la iniciación de la terapia.

Los métodos de estudio de tropismo viral descritos hasta la fecha, los cuales aparecen resumidos en el apartado 1.2.5 de la introducción, presentan una serie de limitaciones técnicas.

En el caso de la secuenciación de las envueltas, el problema radica en que la correlación entre secuencia (genotipo) y tropismo (fenotipo) es compleja y no está bien definida. Los métodos que predicen el tropismo a partir de la secuencia de la región V3 presentan una especificidad bastante alta para la predicción de los virus con tropismo R5, pero su sensibilidad para detectar virus que utilizan el correceptor CXCR4 es menor (Jensen y van

't Wout, 2003). La correlación entre genotipo y fenotipo aun es peor en el caso de los virus con tropismo dual. Los determinantes moleculares responsables del tropismo dual no están bien establecidos, pudiendo coincidir la secuencia de su región V3 con la de virus de tropismo X4 (Troupin y col., 2001) o R5 (van Baelen y col., 2007). Con el fin de detectar motivos que permitan discriminar entre las cepas con tropismo R5, X4 y R5X4, sería importante desarrollar algoritmos que incluyeran regiones fuera de la región V3 que influyen en el tropismo. Otra desventaja de este método es su baja sensibilidad para la detección de variantes minoritarias en la población viral (Skrabal y col., 2007), ya que la secuenciación de la población viral no permite detectar cuasiespecies por debajo de un umbral del 20-25%.

Así pues, no es recomendable emplear únicamente métodos genotípicos, debido a las limitaciones que presentan. Sin embargo, al tratarse de métodos rápidos y baratos se podrían utilizar combinados con ensayos fenotípicos. Una alternativa es generar una base de datos con información genotípica y fenotípica de un número elevado de muestras, de tal forma que, una vez obtenido el genotipo de la envuelta se podrían identificar los distintos fenotipos asociados al mismo. Este sistema, denominado fenotipo virtual, actualmente se emplea para la predicción de resistencias fenotípicas a inhibidores, conferidas por mutaciones en los genes de la transcriptasa inversa y proteasa (Larder y col., 2000). Los laboratorios Virco crearon una base de datos con información de más de 30.000 muestras para establecer el fenotipo virtual en el gen *pol*. La base de datos se actualiza constantemente, debido a la aparición de nuevos fármacos y patrones de resistencia. En el caso de la envuelta, esta complejidad se incrementa debido a su alta variabilidad, gran extensión y mayor capacidad de adaptación al medio. En consecuencia, en un futuro, se necesitarían bases de datos del orden de decenas de miles de secuencias para englobar un número suficiente de muestras que permitieran realizar una predicción certera del tropismo viral.

Una segunda alternativa sería reservar los métodos fenotípicos para aquellos casos en los que los algoritmos son imprecisos y no permiten una correcta caracterización genotípica del tropismo, por ejemplo, para pacientes en estadios avanzados, en los que se incrementa la variabilidad viral y proporción de variantes R5X4.

El aislamiento del VIH-1 en cultivos celulares conlleva un proceso de selección *in vitro* que sesga el espectro de cuasiespecies que replican activamente en el paciente. En estos sistemas de cultivo, la secreción de las quimiocinas RANTES y MIP-1 (Kinter y col., 1996), pero no de CXCL12, por las PBMC favorece la propagación de variantes virales que utilizan el correceptor CXCR4 con respecto a CCR5. Esto es debido a que, a pesar de que la expresión del receptor CCR5 es inducida en linfocitos activados (Bleul y col., 1997), el virus R5 debe



competir con las quimiocinas CC secretadas y este hecho proporciona una ventaja replicativa a las cepas X4. Además, la activación de las PBMC infectadas podría inducir la expresión de genomas del VIH integrados en el ADN del huésped, que no se corresponden con el virus circulante. Las técnicas de cultivo estándar, al usar células indicadoras que expresan CXCR4 (por ejemplo MT-2), no permiten distinguir entre cepas que utilizan exclusivamente el correceptor CXCR4 y aquellas capaces de usar ambos correceptores. Otras desventajas de este tipo de ensayo son la naturaleza cualitativa del mismo, positivo o negativo, y el tiempo y trabajo que conlleva.

La eficacia de recombinación genética utilizando ensayos clásicos de virus recombinantes es baja para el gen *env*. El ensayo generado por el grupo de Fabrizio Mammano (Trouplin y col., 2001) presenta, junto con la mencionada previamente, otra desventaja. Esta consiste en que dicho método únicamente incluye una región de alrededor de 900 p.b. entre las regiones V1 y V3 de la envuelta. Como se ha descrito la presencia de determinantes genéticos implicados en el uso por el correceptor en otras regiones del gen *env*, es esencial la inclusión de la envuelta completa en cualquier método de estudio de tropismo. Además, la exclusión de ciertas regiones del gen de la envuelta podría afectar a la elucidación de los determinantes moleculares y mecanismos de inhibición de los antagonistas de los correceptores.

Un sistema que adolece de las mismas limitaciones es el recientemente publicado por Kurt van Baelen y colaboradores (van Baelen y col., 2007), en el que únicamente clonan la región NH2-V4 de gp120. Otra desventaja que presenta este método es la detección de la expresión de la proteína GFP a los cinco días de la infección. En el sistema que proponemos, la detección de la expresión de la luciferasa Renilla es mucho más rápida, pudiéndose medir 24 horas después de la infección.

El sistema de pseudotipado denominado Trofile™ (Monogram Biosciences, CA USA) descrito por el grupo de Christos J. Petropoulos (Whitcomb y col., 2007), a pesar de considerarse como el mejor método descrito hasta el momento, presenta algunas limitaciones, como su baja sensibilidad. Las interacciones entre las proteínas Gag del vector viral y las proteínas de la envuelta derivada del paciente pueden afectar a la eficiencia del pseudotipado y, en consecuencia, a la infectividad. El límite de detección de variantes minoritarias en la población viral de este método se encuentra en un rango entre 5% y 10%. En el contexto del tratamiento con los inhibidores de los correceptores serían importantes niveles más bajos de detección. En el caso concreto del compuesto UK-427,857 (Maraviroc), un estudio, valiéndose del método Trofile™, constató la emergencia de virus con tropismo X4 en

pacientes en los que se detectaron únicamente variantes R5 al inicio del tratamiento (Westby y col., 2006). En realidad, se trataba de variantes X4 que existían previamente y su aparición no se debió a un cambio de tropismo provocado por el tratamiento. La no detección de estas variantes minoritarias está relacionada con la baja sensibilidad del método de estudio de tropismo utilizado.

El sistema de estudio de tropismo descrito en esta tesis se basa en la amplificación del gen completo de la envuelta del VIH-1 de la población viral presente en el plasma del paciente en estudio. De esta forma, queda representada la población viral que replica en el paciente. Al incluirse la envuelta completa, estarían contenidos todos los determinantes implicados en el tropismo. Dicho sistema permite amplificar el gen de la envuelta del VIH-1 a partir de muestras de plasma con 1000 copias/ml (Figura 4-1) y de virus con distintos subtipos (Figura 4-3).

En comparación con las técnicas de recombinación homóloga y pseudotipado, el clonaje directo de la envuelta viral en un vector único presenta una eficacia mayor en la generación de virus recombinantes, lo que se traduce en una mayor representación de la heterogeneidad viral presente en la muestra del paciente.

Entre las ventajas que presenta frente a otros sistemas utilizados actualmente (p.e. Trofile™), se encuentra la generación de virus recombinantes capaces de realizar varios ciclos de replicación (Figura 4-4). Este hecho provoca un incremento en la señal de la actividad luciferasa, aumentando la sensibilidad del ensayo. Además, estos virus de ciclo múltiple son capaces de infectar y replicar tanto en líneas celulares transformadas como en PBMC (Tabla 4-1).

Además, el sistema desarrollado presenta la posibilidad de analizar el fenotipo y genotipo de las envueltas, tanto de la población viral del paciente como de los clones que la componen. El estudio de la envuelta a nivel clonal podría ser útil, por ejemplo, para establecer el porcentaje de virus X4 en la población que sería aceptable cuando se inicia tratamiento con un antagonista de CCR5, o para determinar las mutaciones implicadas en la aparición de variantes resistentes.

Otra característica de este sistema es su alta sensibilidad en la detección de variantes minoritarias, que se encuentra en torno al 1% (Figura 4-5). Este ensayo al poseer una sensibilidad superior a la de otros métodos, permitiría identificar, antes de iniciar el tratamiento con los antagonistas de CCR5, variantes X4 minoritarias preexistentes en la cuasiespecie que serían indetectables con otros métodos.

Se trata de un ensayo rápido ya que en menos de dos semanas se puede determinar el tropismo de las muestras a analizar, reduciéndose considerablemente el tiempo frente a los sistemas convencionales de detección de replicación viral.

Otras aplicaciones de este sistema de generación de virus recombinantes en la envuelta son: la detección de anticuerpos neutralizantes en suero de pacientes, el estudio de la susceptibilidad de determinados aislados virales a la neutralización por anticuerpos y la caracterización de la actividad antiviral de nuevos compuestos frente al VIH-1 que tienen como diana la envuelta viral.

## **5.2 EVOLUCIÓN DEL TROPISMO IN VIVO: ESTADIO DE PRIMOINFECCIÓN**

En esta tesis, se ha estudiado el genotipo y fenotipo de virus de individuos con infección reciente adquirida por las tres vías de transmisión conocidas: sexual, intravenosa y vertical. Independientemente de la vía de transmisión, el tropismo fue predominantemente de tipo R5. Estos resultados apoyan datos publicados previamente (Van't Wout y col., 1994) y aportan nuevas observaciones originales.

En la mayoría de los estudios previos, se dedujo el tropismo a partir de la secuencia de la región V3 de la envuelta (McNearney y col., 1992; Zhang y col., 1993; Zhu y col., 1996) o utilizando virus aislados en cultivos celulares (Roos y col., 1992; Keet y col., 1993; Van't Wout y col., 1994; Li y col., 1999; Lawson y col., 2002). Como se ha señalado en el apartado anterior, ambos métodos pueden llegar a conclusiones erróneas sobre el tropismo viral. Por tanto, es de interés confirmar el tropismo durante la primoinfección con un método más fiable, como el descrito en este trabajo.

Un inconveniente potencial de nuestro sistema podría consistir en una amplificación preferente de las envueltas con tropismo R5. Para verificar que el sistema de tropismo desarrollado no favorece la amplificación de envueltas con un determinado tropismo frente a otro, hemos alineado los oligonucleótidos diseñados con secuencias de virus R5 y X4, no observándose una mejor hibridación de los cebadores utilizados con un tipo de virus con respecto al otro.

A través de la comparación del genotipo y fenotipo de virus procedentes del donante en el momento antes de la transmisión con los del individuo receptor, se ha llegado a la conclusión de que el virus transmitido, a menudo, representa una variante menor en el

donante (Wolfs y col., 1992). De este hecho se deduce que la selección tiene lugar en el nuevo huésped.

Se ha sugerido que en la primoinfección las variantes X4 son eliminadas del cuerpo por el sistema inmune (Baur y col., 1989). Sin embargo, nuestros datos, al igual que otros anteriores (Zhang y col., 1993; Van't Wout y col., 1994; Lawson y col., 2002), muestran una infección con virus R5 antes de la seroconversión, lo cual indica que la selección de los virus de tipo R5 puede ocurrir antes de la inducción de una respuesta inmune humoral o celular.

En cuanto al genotipo, las secuencias de la región V3 de las envueltas de los virus de la fase aguda de la infección, mostraban una variabilidad muy baja entre sí (Tabla 4-5). Esta baja variabilidad entre las secuencias de la envuelta, al igual que el fenotipo predominante de tipo R5, indica que ocurre una selección durante la primoinfección.

En el caso de los virus R5, la interpretación del patrón y la carga de su secuencia se correspondió con el tropismo obtenido mediante el ensayo biológico. En cambio, en los virus de tropismo dual, 11476 y 42031, no hay una concordancia clara entre la interpretación genotípica y fenotípica.

El estudio de las características de los virus transmitidos tiene relevancia para el diseño de una vacuna frente al VIH, debido a que esta debería inducir una respuesta inmune dirigida contra estos virus específicos para prevenir su transmisión.

### **5.2.1 Transmisión sexual**

Se han propuesto distintos fenómenos para explicar la selección de variantes con tropismo R5 en las mucosas durante la primoinfección por vía sexual. Se ha postulado (Berlier y col., 2005) que las células epiteliales del tracto genital femenino expresan en su superficie las moléculas CXCR4 y galactosilceramida (GalCer) y capturan selectivamente virus X4, integrando el ADN proviral, sin una producción importante de partículas virales. Este secuestro de las cepas X4 favorecería la propagación de los virus R5.

Otros autores (Meng y col., 2002) proponen que la expresión de CCR5 y de GalCer, pero no de CXCR4, en células epiteliales del intestino indica un mecanismo para la transmisión selectiva de virus R5 a las células diana en la primoinfección adquirida a través del tracto gastrointestinal.

Además, se ha demostrado que en las membranas de las mucosas hay una alta expresión de CXCL12 y una regulación negativa de CXCR4 en los linfocitos (Agace y col.,

2000). La producción de esta quimiocina por los epitelios de las mucosas actuaría como barrera de los virus X4.

### **5.2.2 Transmisión parenteral**

Son pocos los estudios descritos sobre el tropismo de los virus de pacientes en el estadio de primoinfección infectados por vía intravenosa. No obstante, al igual que nosotros, observan un tropismo mayoritario de tipo R5 (Van't Wout y col., 1994; Spijkerman y col., 1995; Pratt y col., 1995; Cornelissen y col., 1995; de Mendoza y col., 2007). En el estudio de Carmen Mendoza y colaboradores (de Mendoza y col., 2007), la proporción de virus que utilizan el correceptor CXCR4 es algo mayor (35,7%) que en el resto y que en el nuestro (14,3%). Puede tratarse de una sobreestimación debido a que emplean una herramienta informática que predice el uso por el correceptor y no lo corroboran mediante un ensayo fenotípico.

Por tanto, la selección de variantes con tropismo R5 también ocurre en aquellos casos en los que la mucosa es evitada en la transmisión. Se desconoce el mecanismo implicado en dicha selección en la transmisión parenteral. El grupo de M. Schutten (Schutten y col., 2001) propone que los linfocitos T citotóxicos (CTLs) controlan la replicación de los virus con tropismo macrofágico menos eficientemente que la de los virus no macrofágicos. Valiéndose como modelo experimental de un ratón reconstituido con PBMC humanas encuentran que un clon con tropismo macrofágico escapa más eficientemente de la presión de los CTLs que su homólogo no macrofágico. Sin embargo, dicha teoría no explicaría la selección de variantes R5 previa a la generación de una respuesta inmune específica frente al VIH.

### **5.2.3 Transmisión vertical**

Varios estudios indican que las cepas con tropismo R5 se transmiten de la madre a su descendencia (Ometto y col., 1995; De Rossi y col., 1997; Wade y col., 1998; Lathey y col., 1999; Melendez-Guerrero y col., 2001). Sin embargo, existe mucha controversia al respecto e incluso se ha descrito una transmisión preferencial de variantes X4 (Scarlati y col., 1993; Jansson y col., 1997; Colognesi y col., 1997; Pasquier y col., 1998). En varios de estos estudios se analizó el fenotipo de virus aislados en cultivos celulares. Como se ha discutido anteriormente (apartado 5.1), estos virus pueden diferir de los circulantes en el plasma del paciente al estar favorecida la replicación de los virus X4 respecto a la de los R5.

Por otra parte, el citotrofoblasto placentario actúa como barrera frente al VIH durante el embarazo, pero al avanzar la gestación y afinarse la capa del mismo aumenta la susceptibilidad de atravesar dicha barrera. Los trofoblastos de la placenta producen CXCL12 (Hanna y col., 2003), que podría estar implicada en la selección de los virus R5 durante la transmisión intrauterina.

Por último, se ha descrito que el timo podría ser una fuente de VIH en estado de latencia (Brooks y col., 2001) y que hay una mayor expresión de CXCR4 que de CCR5 en el timo (Kitchen y Zack, 1999). Por tanto, este órgano podría funcionar como un reservorio de virus X4, que se encuentran en su forma proviral. En cambio, el virus circulante en el plasma sanguíneo, tal como hemos observado, presentaría tropismo R5. Un aspecto interesante a explorar a partir de nuestros resultados es la comparación entre el virus aislado a partir de linfocitos y el circulante en plasma para comprender esta discrepancia.

#### **5.2.4 Virus con tropismo dual**

El análisis de las poblaciones virales con tropismo dual de pacientes en el estadio de primoinfección mostró que estaban compuestas por virus capaces de entrar por ambos correceptores, R5X4. En los dos casos estudiados, se trató de una población bastante homogénea en cuanto a su secuencia (Figura 4-9 y Figura 4-10). Estos datos apuntan a que en la fase aguda de la infección hay una presión negativa que impide la emergencia de las cepas X4, ya que en poblaciones virales de pacientes en fase crónica se han encontrado cepas de tipo R5X4, junto con otras R5 o/y X4 (Spudich y col., 2005; Huang y col., 2007).

### **5.3 PROPAGACIÓN DE VIRUS R5 Y X4 EN LA SINAPSI VIROLÓGICA**

#### **5.3.1 Expresión de CXCL12 *in vivo***

En el ganglio linfático (Figura 4-11) prácticamente la totalidad de las células que expresan DC-SIGN y que, por tanto tienen un fenotipo de células dendríticas, producen CXCL12, pero además se observan otros tipos celulares que producen CXCL12. Previamente se ha descrito una producción de CXCL12 por células Langerhans de la piel (Pablos y col., 1999), que conlleva a una internalización del receptor CXCR4 (Zaitseva y col., 1997; Pablos y col., 1999). La producción de esta quimiocina por células dendríticas, en el ganglio linfático, podría tener como función fisiológica atraer linfocitos T en reposo, que expresan el

receptor CXCR4 en membrana. De esta manera, se produciría el reclutamiento de linfocitos T por las células dendríticas, favoreciéndose así el proceso de reconocimiento antigénico. Dicha proteína también podría estar implicada en la migración de las células dendríticas inmaduras hacia los órganos linfoides.

### **5.3.2 Facilitación de la propagación a linfocitos de virus R5 y R5X4 en la sinapsis virológica**

En el modelo de infección *in vitro*, descrito en el apartado 4.3.3, las células dendríticas se cultivaron con linfocitos autólogos para evitar fenómenos alorreactivos. En este sistema se optó por utilizar células dendríticas maduras, en vez de inmaduras, porque *in vivo* dichas células son las encargadas de transferir el VIH a los linfocitos presentes en los órganos linfoides. Las MDC poseen una eficiencia mayor en la transmisión de los virus a las células T en comparación con las IDC (Sanders y col., 2002). Esto puede deberse a una mayor expresión en las MDC de CD40 y otras moléculas coestimuladoras implicadas en la activación de las células T, lo que las haría más susceptibles a la infección.

Como se muestra en la Figura 4-14, no se detectó actividad luciferasa en las células dendríticas en las condiciones de tiempo de infección y dosis virales descritas. Por lo tanto, la infección directa de las MDC parece no jugar un papel importante en nuestro modelo *in vitro*.

Los virus con los que se han realizado los experimentos de infección no expresan la proteína Nef. Se ha hablado de un papel de esta proteína en el tráfico intracelular de DC-SIGN (Sol-Foulon y col., 2002), de tal forma que reduce la internalización de esta molécula incrementando su expresión en superficie. Esta interferencia de Nef en la expresión de DC-SIGN sólo ocurre en ciertos grupos de células dendríticas inmaduras (Messmer y col., 2000) y no en MDC. Finalmente, al trabajar con modelos de infección no productiva de MDC, la proteína Nef no tendría influencia en el modelo experimental desarrollado en este trabajo.

En el sistema de infección *in vitro* utilizado, tanto mediante medición de la actividad luciferasa como mediante técnicas de inmunofluorescencia (Figura 4-14), hemos observado una mayor transferencia de los virus con tropismo R5 frente a los X4 desde las MDC a los linfocitos. En estudios previos no se ha detectado tal diferencia en la facilitación de la propagación. Probablemente, esto sea debido a distintos factores, como la utilización de líneas celulares que expresan DC-SIGN pero no producen CXCL12 (Geijtenbeek y col., 2000b; Trumpfheller y col., 2003) o de células dendríticas inmaduras (Kwon y col., 2002; Engering y col., 2002; Trumpfheller y col., 2003; Pollakis y col., 2004) que, según nuestros resultados

(Figura 4-11), producen una baja cantidad de CXCL12. Además, en la mayoría de estos estudios (Geijtenbeek y col., 2000b; Kwon y col., 2002; Engering y col., 2002; Trumfheller y col., 2003; Turville y col., 2004), únicamente muestran los resultados obtenidos con virus R5 y no se describe la facilitación de la infección por virus de tropismo X4.

Los virus con tropismo dual presentaron un perfil muy similar al de los virus R5 (Figura 4-17). En este caso, también se produjo una facilitación de la transmisión viral propiciada por las MDC. CXCL12 actuaría, por tanto, como un filtro, que bloquearía la entrada por CXCR4 pero permitiría la entrada a través del correceptor CCR5. En el supuesto de que *in vivo* el comportamiento de estos virus de tropismo dual fuera el mismo, el tratamiento con antagonistas con CCR5 sería muy recomendable. Se puede prever que este fármaco inhibiría la entrada a través del correceptor CCR5 mientras que CXCL12 bloquearía la unión a CXCR4. De hecho, estudios preliminares (Mayer y col., 2006) muestran que el antagonista de CCR5 Maraviroc es beneficioso en pacientes infectados con virus de tropismo dual. En este contexto, sería interesante determinar la eficacia que tienen estos antagonistas en la sinapsis virológica para confirmar la hipótesis planteada.

### **5.3.3 Interacción del VIH-1 con DC-SIGN y presentación en *trans* a los linfocitos**

En nuestro sistema de infección *in vitro* cuando tratamos las MDC con tripsina (Figura 4-15) disminuyó significativamente la infección, lo cual sugiere que estas células están capturando el VIH-1 a través de la molécula DC-SIGN, para posteriormente transmitirlo a los linfocitos autólogos. Asimismo, los datos obtenidos indican que la transmisión secundaria a la infección de las células dendríticas por el VIH, no ocurre en el sistema *in vitro* desarrollado. Como se ha señalado en el apartado anterior, no se detecta actividad luciferasa en los cultivos de MDC incubadas con el virus (Figura 4-14), lo que indica que estas células no se infectan en las condiciones experimentales descritas. Se ha mostrado (Granelli-Piperno y col., 1998) que la infección de las células dendríticas depende del grado de maduración de estas células, siendo más eficiente en IDC que en MDC. Otro factor que podría contribuir a la infección de las DC es el tiempo de exposición al virus. En concreto, se ha propuesto (Turville y col., 2004) que la transferencia del VIH de las DC a las células T ocurre en dos fases: una fase a corto plazo de transferencia viral en *trans*, y una fase a largo plazo, que ocurriría a partir de las 48 horas, de transmisión de las partículas virales sintetizadas por las IDC infectadas. Los



tiempos utilizados en nuestro sistema descartarían este segundo mecanismo de transmisión viral en la sinapsis virológica.

La disminución de la infección tras el tratamiento con tripsina, también descartaría la internalización del virus y su posterior exportación a la superficie como mecanismo de transmisión. Este mecanismo, descrito por Kwon y colaboradores (Kwon y col., 2002), consiste en la internalización del VIH, mediada por DC-SIGN, a un compartimento no lisosomal de bajo pH, en el que el virus mantendría su infectividad durante largos periodos dentro de la célula dendrítica. Este mecanismo ha sido cuestionado por varios grupos. Se ha demostrado que inhibidores de la acidificación vesicular no bloquean la transmisión del VIH desde las DC a los linfocitos (Nobile y col., 2005). Además, se ha observado que los viriones endocitados a través de DC-SIGN son rápidamente degradados en la célula dendrítica (Moris y col., 2004).

Basándonos en los datos presentados en la Figura 4-18, deducimos que el VIH-1 se une a DC-SIGN independientemente de su tropismo. En estos experimentos, a diferencia de lo observado en los cultivos de linfocitos y MDC, las IDC potenciaron un incremento de la infección tanto de los virus R5 como de los X4. En consecuencia, la mejor transmisión de los virus con tropismo R5 desde las MDC a los linfocitos no se debe a una mayor avidéz de esta lectina por las variantes R5, ya que los niveles de DC-SIGN fueron similares en IDC y MDC (Figura 4-12).

#### **5.3.4 Interferencia de la quimiocina CXCL12 producida por las células dendríticas maduras en la propagación de las cepas X4**

Se ha detectado una mayor producción de CXCL12 en las células dendríticas maduras que en las inmaduras (Figura 4-11), lo que sugiere que durante el proceso de diferenciación y maduración de las células dendríticas, tiene lugar un proceso de regulación positiva de la expresión génica de esta proteína.

Nuestros datos sugieren que la quimiocina CXCL12 producida por las MDC está implicada en la inhibición de la propagación de los virus X4 en el sistema de infección *in vitro* descrito. Esta relación causa-efecto, entre la producción de CXCL12 y la inhibición de la propagación de los virus X4, se establece en nuestro sistema, ya que el bloqueo del efecto provocado por CXCL12 mediante ARNs de interferencia (Figura 4-22) o un anticuerpo específico frente a esta proteína (Figura 4-19 y Figura 4-20) incrementó la propagación de los virus con tropismo X4.

Con todo, al tratar las células con el anticuerpo K15C el incremento de la infección provocado por las DC no llegó a los niveles obtenidos en el caso de los virus R5. Una explicación podría ser la existencia de una baja proporción de CXCL12 soluble, que se encontraría asociado preferentemente a la membrana celular, lo que le haría menos susceptible a la neutralización por anticuerpos. En este sentido, se ha publicado que esta quimiocina se asocia a heparán sulfatos (Amara y col., 1999), una molécula que se expresa en las DC como se muestra en la Figura 4-12.

Con el fin de neutralizar totalmente el efecto de CXCL12, intentamos bloquear la síntesis de la proteína CXCL12 usando ARNs de interferencia dirigidos contra el ARN mensajero de la misma. Pero debido a problemas técnicos en la transfección de las células dendríticas maduras, sólo hemos conseguido una eficiencia en la transfección del 25%. Esta baja eficiencia en la transfección puede ser la responsable de que, en este caso, tampoco se alcancen los valores de infección obtenidos por el virus R5.

### 5.3.5 Modelo propuesto

En el contexto de la infección por el VIH-1, la quimiocina CXCL12 contribuiría a seleccionar las variantes que infectan los linfocitos CD4. La célula dendrítica en la infección por el VIH-1 dejaría de ser un elemento central en la generación de la respuesta inmune, transformándose en un foco privilegiado de propagación de la infección. Debido a la presencia de DC-SIGN, las partículas del VIH-1 se concentrarían en la superficie de las células dendríticas facilitando la infección a los linfocitos circundantes, como ha sido demostrado en numerosos trabajos. La producción de la quimiocina CXCL12 por células dendríticas tendría un efecto perjudicial, en cuanto que contribuiría a atraer a los linfocitos CD4 a los nichos más favorables para la infección. Por tanto, el VIH-1 utilizaría dos mecanismos cuya función es potenciar la respuesta inmune, la producción de quimiocinas y la avidéz por la unión a DC-SIGN, para favorecer su propagación y facilitar la infección de los linfocitos CD4 en la sinapsis virológica. Sin embargo, la producción de CXCL12 por DC tendría un efecto parcialmente beneficioso al impedir la propagación de las variantes X4. Además, como se ha señalado, en el ganglio linfático otras células de estirpe diferente a las DC producen CXCL12, lo que podría contribuir al incremento en los niveles de CXCL12 en el espacio extracelular y a la interferencia con la propagación de variantes X4. Se daría, por tanto, en el ganglio linfático una situación similar a la descrita en la lámina propia intestinal, en que la producción de CXCL12 bloquea la infección por variantes X4 por vía sexual.

Los resultados obtenidos en la segunda parte de este trabajo, mostrando que en la infección por vía intravenosa, también se seleccionan variantes R5 en la mayoría de los casos apoyaría la hipótesis de que la producción de CXCL12 bloquea selectivamente la propagación de variantes X4 en la sinapsis virológica.

En los estadios finales de la enfermedad podría producirse una disminución en la producción de CXCL12 como consecuencia de la destrucción del sistema linfoide. Esta disminución en los niveles tisulares de CXCL12, junto con el aumento de la replicación viral característico de esta fase de la enfermedad, podría favorecer la emergencia de variantes con tropismo X4.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la producción de la quimiocina CXCL12 por las células dendríticas maduras en los órganos linfoides representa un potente mecanismo antiviral frente a la infección por variantes X4 y un factor de selección en la evolución del tropismo viral *in vivo*.

## 6 CONCLUSIONES

---

1. Se ha desarrollado un sistema que permite la caracterización del tropismo del VIH-1 mediante la generación de virus recombinantes en la envuelta. Entre las ventajas del sistema se encuentran su alta sensibilidad en la detección de variantes minoritarias; la generación de virus de ciclo múltiple y la posibilidad de analizar el fenotipo y genotipo de las envueltas, tanto de los clones como de la población viral del paciente.
2. El tropismo de los virus circulantes en el plasma de pacientes en primoinfección infectados por las tres vías de transmisión (sexual, parenteral y vertical) es predominantemente de tipo R5.
3. El fenotipo dual de los virus de pacientes primoinfectados se debe a una población homogénea compuesta por variantes con tropismo R5X4 y no a una mezcla de clones con diferente tropismo.
4. En el ganglio linfático se detecta una elevada producción de CXCL12 por distintas células, entre ellas, células dendríticas en la región paracortical.
5. En un modelo de infección *in vitro* de linfocitos cultivados con MDC autólogas, se ha demostrado una mayor transmisión de los virus con tropismo R5, que de las variantes X4.
6. Las MDC incrementan la infección tanto de virus R5X4 de referencia como de virus obtenidos de pacientes, lo que sugiere que estos virus de tropismo dual utilizan preferentemente el correceptor CCR5 en la sinapsis virológica.
7. Este fenómeno de incremento en la propagación de variantes R5 y R5X4 en el sistema de infección *in vitro* descrito, no es debido a la infección de MDC sino a la

unión del VIH-1 a la molécula DC-SIGN y su posterior transmisión a los linfocitos CD4.

8. La transmisión de virus X4 desde las MDC a los linfocitos es menor que desde IDC, lo cual correlaciona con una mayor producción de CXCL12 en MDC que en IDC.
9. El bloqueo de la quimiocina CXCL12 incrementa la infección por las cepas X4 del VIH en la sinapsis virológica.
10. Estos datos sugieren que la producción de CXCL12 por MDC en órganos linfoides representa un potente mecanismo antiviral frente a la infección por variantes X4 y un factor de selección en la evolución del tropismo viral *in vivo*.

# BIBLIOGRAFÍA

**Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA.** 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59: 284-291

**Agace WW, Amara A, Roberts AI, Pablos JL, Thelen S, Uguccioni M, Li XY, Marsal J, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Ebert EC, Moser B, Parker CM.** 2000. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr. Biol.* 10: 325-328

**Akira S, Takeda K, Kaisho T.** 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2: 675-680

**Alcamí Pertejo J, González Fernández N, García Perez J, Sánchez Palomino S.** 2005. Novel HIV-based recombinant viral clones and use thereof in analytical methods. PCT/ES2005/000250 ed.

**Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-1958

**Alkhatib G, Locati M, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA.** 1997. HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology* 234: 340-348

**Allaway GP, vis-Bruno KL, Beaudry GA, Garcia EB, Wong EL, Ryder AM, Hasel KW, Gauduin MC, Koup RA, McDougal JS.** 1995. Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11: 533-539

**Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R.** 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J. Virol.* 76: 6841-6844

**Amara A, Gall SL, Schwartz O, Salamero J, Montes M, Loetscher P, Baggiolini M, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F.** 1997. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J. Exp. Med.* 186: 139-146

**Amara A, Lorthioir O, Valenzuela A, Magerus A, Thelen M, Montes M, Virelizier JL, Delepiepierre M, Baleux F, Lortat-Jacob H, Arenzana-Seisdedos F.** 1999. Stromal cell-derived factor-1alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J. Biol. Chem.* 274: 23916-23925

**Arakaki R, Tamamura H, Premanathan M, Kanbara K, Ramanan S, Mochizuki K, Baba M, Fujii N, Nakashima H.** 1999. T134, a small-molecule CXCR4 inhibitor, has no cross-drug resistance with AMD3100, a CXCR4 antagonist with a different structure. *J. Virol.* 73: 1719-1723

**Arrighi JF, Pion M, Garcia E, Escola JM, van Kooyk Y., Geijtenbeek TB, Piguet V.** 2004a. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J. Exp. Med.* 200: 1279-1288

**Arrighi JF, Pion M, Wiznerowicz M, Geijtenbeek TB, Garcia E, Abraham S, Leuba F, Dutoit V, Ducrey-Rundquist O, van Kooyk Y., Trono D, Piguet V.** 2004b. Lentivirus-mediated RNA interference of DC-SIGN expression inhibits human immunodeficiency virus transmission from dendritic cells to T cells. *J. Virol.* 78: 10848-10855

**Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, Shiraishi M, Aramaki Y, Okonogi K, Ogawa Y, Meguro K, Fujino M.** 1999. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 5698-5703

**Balotta C, Bagnarelli P, Violin M, Ridolfo AL, Zhou D, Berlusconi A, Corvasce S, Corbellino M, Clementi M, Clerici M, Moroni M, Galli M.** 1997. Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1-infected patient. *AIDS* 11: F67-F71

**Banchereau J, Steinman RM.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252

**Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Xlér-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871

**Baur A, Schwarz N, Ellinger S, Korn K, Harrer T, Mang K, Jahn G.** 1989. Continuous clearance of HIV in a vertically infected child. *Lancet* 2: 1045

**Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ.** 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385: 640-644

**Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT.** 1997. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J. Biol. Chem.* 272: 30603-30606

**Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA.** 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391: 240

**Berlier W, Bourlet T, Lawrence P, Hamzeh H, Lambert C, Genin C, Verrier B, Dieu-Nosjean MC, Pozzetto B, Delezay O.** 2005. Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV. *J. Med. Virol.* 77: 465-474

**Bermejo Herrero M.** 2003. Tesis doctoral: Expresión de CXCR4 y SDF-1 en linfocitos y células. Universidad Autónoma de Madrid

**Bermejo M, Martín-Serrano J, Alonso J, Pablos JL, Gamallo C, Arenzana F, Alcami J** 2002 SDF-1 production by dendritic cells and regulation of CXCR4 in T lymphocytes. XIV International AIDS Conference, Barcelona, España p 345. Abstract TuOrA1137

**Biti R, Ffrench R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T.** 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat. Med.* 3: 252-253

**Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, Albert J, Scarlatti G, Littman DR, Fenyo EM.** 1997. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J. Virol.* 71: 7478-7487

**Blanco J, Jacotot E, Cabrera C, Cardona A, Clotet B, de CE, Este JA.** 1999. The implication of the chemokine receptor CXCR4 in HIV-1 envelope protein-induced apoptosis is independent of the G protein-mediated signalling. *AIDS* 13: 909-917

**Blanpain C, Doranz BJ, Bondue A, Govaerts C, De LA, Vassart G, Doms RW, Proudfoot A, Parmentier M.** 2003. The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle. *J. Biol. Chem.* 278: 5179-5187

**Blauvelt A, Asada H, Saville MW, Klaus-Kovtun V, Altman DJ, Yarchoan R, Katz SI.** 1997. Productive infection of dendritic cells by HIV-1 and their ability to capture virus are mediated through separate pathways. *J. Clin. Invest* 100: 2043-2053

**Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA.** 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382: 829-833

**Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR.** 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94: 1925-1930

**Bobardt MD, Saphire AC, Hung HC, Yu X, Van der Schueren B., Zhang Z, David G, Galloway PA.** 2003. Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity.* 18: 27-39

**Boyd MT, Simpson GR, Cann AJ, Johnson MA, Weiss RA.** 1993. A single amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp120 alters cellular tropism. *J. Virol.* 67: 3649-3652



- Brelot A, Heveker N, Pleskoff O, Sol N, Alizon M.** 1997. Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *J. Virol.* 71: 4744-4751
- Brooks DG, Kitchen SG, Kitchen CM, Scripture-Adams DD, Zack JA.** 2001. Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nat. Med.* 7: 459-464
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R.** 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553
- Burleigh L, Lozach PY, Schiffer C, Staropoli I, Pezo V, Porrot F, Canque B, Virelizier JL, renzana-Seisdedos F, Amara A.** 2006. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J. Virol.* 80: 2949-2957
- Cabrera C, Gutierrez A, Barretina J, Blanco J, Litovchick A, Lapidot A, Clotet B, Este JA.** 2002. Anti-HIV activity of a novel aminoglycoside-arginine conjugate. *Antiviral Res.* 53: 1-8
- Cambi A, Koopman M, Figdor CG.** 2005. How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol.* 7: 481-488
- Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM.** 1992. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* 257: 383-387
- Carrillo A, Ratner L.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-lymphoid cell lines: role of the V3 loop and C4 envelope determinants. *J. Virol.* 70: 1301-1309
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, zutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, Yoneda K, Imamura S, Schmitt D, Banchereau J.** 1996. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J. Exp. Med.* 184: 695-706
- Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89: 263-273
- Charbonnier AS, Verrier B, Jacquet C, Massacrier C, Fiers MM, Mallet F, zutter-Dambuyant C, Schmitt D.** 1996. In vitro HIV1 infection of CD34+ progenitor-derived dendritic/Langerhans cells at different stages of their differentiation in the presence of GM-CSF/TNF alpha. *Res. Virol.* 147: 89-95
- Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC.** 2005. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 433: 834-841
- Choe H, Farzan M, Konkel M, Martin K, Sun Y, Marcon L, Cayabyab M, Berman M, Dorf ME, Gerard N, Gerard C, Sodroski J.** 1998. The orphan seven-transmembrane

receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72: 6113-6118

**Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J.** 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85: 1135-1148

**Choi YK, Whelton KM, Mlechick B, Murphey-Corb MA, Reinhart TA.** 2003. Productive infection of dendritic cells by simian immunodeficiency virus in macaque intestinal tissues. *J. Pathol.* 201: 616-628

**Clapham PR, McKnight A.** 2002. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 83: 1809-1829

**Clapham PR, McKnight A, Weiss RA.** 1992. Human immunodeficiency virus type 2 infection and fusion of CD4-negative human cell lines: induction and enhancement by soluble CD4. *J. Virol.* 66: 3531-3537

**Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, Roberson JL, Veldkamp PJ, Kappes JC, Hahn BH, Shaw GM.** 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 324: 954-960

**Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, et al.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343-346

**Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P.** 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270: 1811-1815

**Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P.** 1996. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat. Med.* 2: 1244-1247

**Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, et al.** 1986. What to call the AIDS virus? *Nature* 321: 10

**Collman R, Balliet JW, Gregory SA, Friedman H, Kolson DL, Nathanson N, Srinivasan A.** 1992. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 66: 7517-7521

**Colognesi C, Halapi E, Jansson M, Hodara V, Steuer G, Tresoldi E, Leitner T, Scarlatti G.** 1997. The role of virologic and immunologic factors in mother-to-child transmission of HIV-1. *Am. J. Reprod. Immunol.* 38: 197-200

**Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL, Murphy PM.** 1996. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and RANTES. *J. Leukoc. Biol.* 60: 147-152

**Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM.** 1998. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J. Biol. Chem.* 273: 23799-23804

**Connor RI, Chen BK, Choe S, Landau NR.** 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206: 935-944

**Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR.** 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J. Exp. Med.* 185: 621-628

**Cornelissen M, Mulder-Kampinga G, Veenstra J, Zorgdrager F, Kuiken C, Hartman S, Dekker J, van der Hoek L, Sol C, Coutinho R.** 1995. Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population. *J. Virol.* 69: 1810-1818

**Cowan MJ, Hellmann D, Chudwin D, Wara DW, Chang RS, Ammann AJ.** 1984. Maternal transmission of acquired immune deficiency syndrome. *Pediatrics* 73: 382-386

**Crabb C.** 2006. GlaxoSmithKline ends aplaviroc trials. *AIDS* 20: 641

**Daelemans D, Schols D, Witvrouw M, Pannecouque C, Hatse S, van Dooren S., Hamy F, Klimkait T, de CE, VanDamme AM.** 2000. A second target for the peptoid Tat/transactivation response element inhibitor CGP64222: inhibition of human immunodeficiency virus replication by blocking CXC-chemokine receptor 4-mediated virus entry. *Mol. Pharmacol.* 57: 116-124

**Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-767

**De Clercq E.** 2001. New developments in anti-HIV chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* 8: 1543-1572

**De Cock KM, Adjarlolo G, Ekpini E, Sibailly T, Kouadio J, Maran M, Brattegaard K, Vetter KM, Doorly R, Gayle HD.** 1993. Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. *JAMA* 270: 2083-2086

**de Mendoza C, Rodriguez C, Garcia F, Eiros JM, Ruiz L, Caballero E, Aguilera A, Leiva P, Colomina J, Gutierrez F, del RJ, Agüero J, Soriano V.** 2007. Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 698-704

**De Rossi A, Ometto L, Masiero S, Zanchetta M, Chieco-Bianchi L.** 1997. Viral phenotype in mother-to-child HIV-1 transmission and disease progression of vertically acquired HIV-1 infection. *Acta Paediatr. Suppl* 421: 22-28

**Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ.** 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273: 1856-1862

**Deen KC, McDougal JS, Inacker R, Folena-Wasserman G, Arthos J, Rosenberg J, Maddon PJ, Axel R, Sweet RW.** 1988. A soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection. *Nature* 331: 82-84

**Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di MP, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666

**Donzella GA, Schols D, Lin SW, Este JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, de CE, Moore JP.** 1998. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the *CXCR4* co-receptor. *Nat. Med.* 4: 72-77

**Doranz BJ, Grovit-Ferbas K, Sharron MP, Mao SH, Goetz MB, Daar ES, Doms RW, O'Brien WA.** 1997a. A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor *CXCR4* prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J. Exp. Med.* 186: 1395-1400

**Doranz BJ, Lu ZH, Rucker J, Zhang TY, Sharron M, Cen YH, Wang ZX, Guo HH, Du JG, Accavitti MA, Doms RW, Peiper SC.** 1997b. Two distinct *CCR5* domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 71: 6305-6314

**Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW.** 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors *CCR5*, *CCR3*, and *CCR2b* as fusion cofactors. *Cell* 85: 1149-1158

**Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA.** 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor *CCR5*. *Nature* 381: 667-673

**Dumonceaux J, Nisole S, Chanel C, Quivet L, Amara A, Baleux F, Briand P, Hazan U.** 1998. Spontaneous mutations in the *env* gene of the human immunodeficiency virus type 1 *NDK* isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype. *J. Virol.* 72: 512-519

**Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA.** 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (*ICAM-1*). *J. Immunol.* 137: 245-254

**Dustin ML, Springer TA.** 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341: 619-624

**Dzionic A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J.** 2001. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J. Exp. Med.* 194: 1823-1834

**Edinger AL, Hoffman TL, Sharron M, Lee B, O'Dowd B, Doms RW.** 1998. Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* 249: 367-378

**Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T.** 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26: 199-213

**Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, Ahuja M, Turner JD, McKnight A, Thomas JF, Stoebenau-Haggarty B, Choe S, Vance PJ, Wells TN, Power CA, Sutterwala SS, Doms RW, Landau NR, Hoxie JA.** 1996. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 87: 745-756

**Engering A, van Vliet SJ, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y.** 2002. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* 100: 1780-1786

**Esche C, Stellato C, Beck LA.** 2005. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J. Invest Dermatol.* 125: 615-628

**Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debre P, Theodorou I, Combadiere C.** 2000. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* 287: 2274-2277

**Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877

**Figdor CG, van Kooyk Y., Adema GJ.** 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 77-84

**Fisher RA, Bertonis JM, Meier W, Johnson VA, Costopoulos DS, Liu T, Tizard R, Walker BD, Hirsch MS, Schooley RT, et al.** 1988. HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature* 331: 76-78

**Fong L, Mengozzi M, Abbey NW, Herndier BG, Engleman EG.** 2002. Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J. Virol.* 76: 11033-11041

**Fortin JF, Cantin R, Lamontagne G, Tremblay M.** 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J. Virol.* 71: 3588-3596

**Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schuitemaker H.** 1992. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol.* 66: 3183-3187

**Frade JM, Llorente M, Mellado M, Alcami J, Gutierrez-Ramos JC, Zaballos A, Real G, Martinez A.** 1997. The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection. *J. Clin. Invest* 100: 497-502

**Freed EO, Myers DJ, Risser R.** 1990. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 4650-4654

**Furci L, Scarlatti G, Burastero S, Tambussi G, Colognesi C, Quillent C, Longhi R, Loverro P, Borgonovo B, Gaffi D, Carrow E, Malnati M, Lusso P, Siccardi AG, Lazzarin A, Beretta A.** 1997. Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(+) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. *J. Exp. Med.* 186: 455-460

**Gallaher WR.** 1987. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* 50: 327-328

**Garcia-Perez J, Sanchez-Palomino S, Perez-Olmeda M, Fernandez B, Alcami J.** 2007. A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J. Med. Virol.* 79: 127-137

**Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Kaplan MH, Gallo RC, Popovic M.** 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233: 215-219

**Garzino-Demo A, Moss RB, Margolick JB, Cleghorn F, Sill A, Blattner WA, Cocchi F, Carlo DJ, DeVico AL, Gallo RC.** 1999. Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory beta-chemokines are associated with AIDS-free status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 11986-11991

**Geijtenbeek TB, Engering A, van Kooyk Y.** 2002a. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J. Leukoc. Biol.* 71: 921-931

**Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, Alon R, Figdor CG, van Kooyk Y.** 2000a. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* 1: 353-357

**Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, Kewalramani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y.**

2000b. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100: 587-597

**Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG.** 2000c. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100: 575-585

**Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, van Kooyk Y.** 2002b. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J. Biol. Chem.* 277: 11314-11320

**Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y.** 2004. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 33-54

**Gendelman HE, Orenstein JM, Baca LM, Weiser B, Burger H, Kalter DC, Meltzer MS.** 1989. The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *AIDS* 3: 475-495

**Gether U.** 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 21: 90-113

**Giannetti A, Zambruno G, Cimarelli A, Marconi A, Negroni M, Girolomoni G, Bertazzoni U.** 1993. Direct detection of HIV-1 RNA in epidermal Langerhans cells of HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 6: 329-333

**Giguel F, Beebe L, Migone TS, Kuritzkes D** 2006 The anti-CCR5 mAb004 inhibits HIV-1 replication synergistically in combination with other antiretroviral agents but does not select for resistance during *in vitro* passage. 13th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Denver. Abstract 505

**Glass WG, McDermott DH, Lim JK, Lekhong S, Yu SF, Frank WA, Pape J, Cheshier RC, Murphy PM.** 2006. CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection. *J. Exp. Med.* 203: 35-40

**Glushakova S, Grivel JC, Fitzgerald W, Sylwester A, Zimmerberg J, Margolis LB.** 1998. Evidence for the HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency. *Nat. Med.* 4: 346-349

**Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC, Clements JE, Narayan O, Gilden RV.** 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 227: 173-177

**Gorry PR, Zhang C, Wu S, Kunstman K, Trachtenberg E, Phair J, Wolinsky S, Gabuzda D.** 2002. Persistence of dual-tropic HIV-1 in an individual homozygous for the CCR5 Delta 32 allele. *Lancet* 359: 1832-1834

**Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML.** 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285: 221-227

**Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W, Steinman RM.** 1998. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J. Virol.* 72: 2733-2737

**Gray L, Churchill MJ, Keane N, Sterjovski J, Ellett AM, Purcell DF, Pombourios P, Kol C, Wang B, Saksena NK, Wesselingh SL, Price P, French M, Gabuzda D, Gorry PR.** 2006. Genetic and functional analysis of R5X4 human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins derived from two individuals homozygous for the CCR5delta32 allele. *J. Virol.* 80: 3684-3691

**Grivel JC, Margolis LB.** 1999. CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 are equally cytopathic for their T-cell targets in human lymphoid tissue. *Nat. Med.* 5: 344-346

**Groenink M, Fouchier RA, Broersen S, Baker CH, Koot M, Van't Wout AB, Huisman HG, Miedema F, Tersmette M, Schuitemaker H.** 1993. Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration. *Science* 260: 1513-1516

**Groot F, Kuijpers TW, Berkhout B, de Jong EC.** 2006. Dendritic cell-mediated HIV-1 transmission to T cells of LAD-1 patients is impaired due to the defect in LFA-1. *Retrovirology.* 3: 75

**Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ.** 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.* 185: 1101-1111

**Haase AT, Henry K, Zupancic M, Sedgewick G, Faust RA, Melroe H, Cavert W, Gebhard K, Staskus K, Zhang ZQ, Dailey PJ, Balfour HH, Jr., Erice A, Perelson AS.** 1996. Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* 274: 985-989

**Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houles C, Fieschi F, renzana-Seisdedos F, Moreau JF, chanet-Merville J.** 2002. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity.* 17: 653-664

**Hanna J, Wald O, Goldman-Wohl D, Prus D, Markel G, Gazit R, Katz G, Haimov-Kochman R, Fujii N, Yagel S, Peled A, Mandelboim O.** 2003. CXCL12 expression by invasive trophoblasts induces the specific migration of CD16- human natural killer cells. *Blood* 102: 1569-1577

**Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N.** 1985. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 229: 563-566



- Hartley O, Offord RE.** 2005. Engineering chemokines to develop optimized HIV inhibitors. *Curr. Protein Pept. Sci.* 6: 207-219
- Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL.** 1997. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 159: 635-643
- Ho DD, Kaplan JC.** 1987. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection and prospects for control. *Yale J. Biol. Med.* 60: 589-600
- Holm GH, Zhang C, Gorry PR, Peden K, Schols D, de CE, Gabuzda D.** 2004. Apoptosis of bystander T cells induced by human immunodeficiency virus type 1 with increased envelope/receptor affinity and coreceptor binding site exposure. *J. Virol.* 78: 4541-4551
- Horuk R, Hesselgesser J, Zhou Y, Faulds D, Halks-Miller M, Harvey S, Taub D, Samson M, Parmentier M, Rucker J, Doranz BJ, Doms RW.** 1998. The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains. *J. Biol. Chem.* 273: 386-391
- Hu J, Gardner MB, Miller CJ.** 2000. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J. Virol.* 74: 6087-6095
- Huang W, Eshleman SH, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Paxinos EE, Whitcomb JM, Young AM, Donnell D, Mmiro F, Musoke P, Guay LA, Jackson JB, Parkin NT, Petropoulos CJ.** 2007. Coreceptor tropism in human immunodeficiency virus type 1 subtype D: high prevalence of CXCR4 tropism and heterogeneous composition of viral populations. *J. Virol.* 81: 7885-7893
- Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA.** 1996. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* 2: 1240-1243
- Hussey RE, Richardson NE, Kowalski M, Brown NR, Chang HC, Siliciano RF, Dorfman T, Walker B, Sodroski J, Reinherz EL.** 1988. A soluble CD4 protein selectively inhibits HIV replication and syncytium formation. *Nature* 331: 78-81
- Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR.** 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 253: 71-74
- Ichiyama K, Yokoyama-Kumakura S, Tanaka Y, Tanaka R, Hirose K, Bannai K, Edamatsu T, Yanaka M, Niitani Y, Miyano-Kurosaki N, Takaku H, Koyanagi Y, Yamamoto N.** 2003. A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100: 4185-4190

**Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM.** 1997. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J. Exp. Med.* 186: 665-672

**Jameson B, Baribaud F, Pohlmann S, Ghavimi D, Mortari F, Doms RW, Iwasaki A.** 2002. Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J. Virol.* 76: 1866-1875

**Janeway CA Jr, Travers P, Hunt S** 1997 *Immunobiology: The immune system in health and disease.* New York: 4:40-4:41

**Jansson M, Orlandi P, Scarlatti G, Moschese V, Romiti ML, Cancrini C, Mancina L, Livadiotti S, Castelli-Gattinara G, Rossi P, Halapi E.** 1997. Role of immunity in maternal-infant HIV-1 transmission. *Acta Paediatr. Suppl* 421: 39-45

**Jensen MA, van 't Wout AB.** 2003. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev.* 5: 104-112

**Kammerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, van Kooyk Y., Kampgen E.** 2003. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am. J. Pathol.* 162: 887-896

**Keet IP, Krijnen P, Koot M, Lange JM, Miedema F, Goudsmit J, Coutinho RA.** 1993. Predictors of rapid progression to AIDS in HIV-1 seroconverters. *AIDS* 7: 51-57

**Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, .** 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266: 1395-1399

**Kinter AL, Ostrowski M, Goletti D, Oliva A, Weissman D, Gantt K, Hardy E, Jackson R, Ehler L, Fauci AS.** 1996. HIV replication in CD4+ T cells of HIV-infected individuals is regulated by a balance between the viral suppressive effects of endogenous beta-chemokines and the viral inductive effects of other endogenous cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 14076-14081

**Kitchen SG, Zack JA.** 1999. Distribution of the human immunodeficiency virus coreceptors CXCR4 and CCR5 in fetal lymphoid organs: implications for pathogenesis in utero. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15: 143-148

**Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L.** 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312: 767-768

**Kledal TN, Rosenkilde MM, Coulin F, Simmons G, Johnsen AH, Alouani S, Power CA, Lutichau HR, Gerstoft J, Clapham PR, Clark-Lewis I, Wells TN, Schwartz TW.** 1997.

A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Science* 277: 1656-1659

**Kolchinsky P, Kiprilov E, Sodroski J.** 2001. Increased neutralization sensitivity of CD4-independent human immunodeficiency virus variants. *J. Virol.* 75: 2041-2050

**Koot M, Vos AH, Keet RP, de Goede RE, Dercksen MW, Terpstra FG, Coutinho RA, Miedema F, Tersmette M.** 1992. HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay. *AIDS* 6: 49-54

**Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, Wolinsky SM, Zhang L, Guo Y, Deutsch L, Phair J, Neumann AU, Ho DD.** 1998. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat. Med.* 4: 350-353

**Kostrikis LG, Neumann AU, Thomson B, Korber BT, McHardy P, Karanickolas R, Deutsch L, Huang Y, Lew JF, McIntosh K, Pollack H, Borkowsky W, Spiegel HM, Palumbo P, Oleske J, Bardeguez A, Luzuriaga K, Sullivan J, Wolinsky SM, Koup RA, Ho DD, Moore JP.** 1999. A polymorphism in the regulatory region of the CC-chemokine receptor 5 gene influences perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 to African-American infants. *J. Virol.* 73: 10264-10271

**Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD.** 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* 68: 4650-4655

**Koyanagi Y, Miles S, Mitsuyasu RT, Merrill JE, Vinters HV, Chen IS.** 1987. Dual infection of the central nervous system by AIDS viruses with distinct cellular tropisms. *Science* 236: 819-822

**Kwon DS, Gregorio G, Bitton N, Hendrickson WA, Littman DR.** 2002. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity.* 16: 135-144

**Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA.** 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393: 648-659

**Lapointe N, Michaud J, Pekovic D, Chausseau JP, Dupuy JM.** 1985. Transplacental transmission of HTLV-III virus. *N. Engl. J. Med.* 312: 1325-1326

**Larder BA, Kemp SD, Hertogs K.** 2000. Quantitative prediction of HIV-1 phenotypic drug resistance from genotypes: the virtual phenotype (*VirtualPhenotype*). *Antiviral Therapy* 5 (Suppl. 3): 49-50

**Larkin M, Childs RA, Matthews TJ, Thiel S, Mizuochi T, Lawson AM, Savill JS, Haslett C, Diaz R, Feizi T.** 1989. Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *AIDS* 3: 793-798

- Lathey JL, Tsou J, Brinker K, Hsia K, Meyer WA, III, Spector SA.** 1999. Lack of autologous neutralizing antibody to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and macrophage tropism are associated with mother-to-infant transmission. *J. Infect. Dis.* 180: 344-350
- Lawson VA, Oelrichs R, Guillon C, Imrie AA, Cooper DA, Deacon NJ, McPhee DA.** 2002. Adaptive changes after human immunodeficiency virus type 1 transmission. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18: 545-556
- Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J.** 2004. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol. Immunol.* 1: 95-104
- Lee B, Leslie G, Soilleux E, O'Doherty U, Baik S, Levroney E, Flummerfelt K, Swiggard W, Coleman N, Malim M, Doms RW.** 2001. cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J. Virol.* 75: 12028-12038
- Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW.** 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 5215-5220
- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ.** 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265: 10373-10382
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS.** 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840-842
- Li S, Juarez J, Alali M, Dwyer D, Collman R, Cunningham A, Naif HM.** 1999. Persistent CCR5 utilization and enhanced macrophage tropism by primary blood human immunodeficiency virus type 1 isolates from advanced stages of disease and comparison to tissue-derived isolates. *J. Virol.* 73: 9741-9755
- Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, Farber JM.** 1997. STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J. Exp. Med.* 185: 2015-2023
- Liu H, Chao D, Nakayama EE, Taguchi H, Goto M, Xin X, Takamatsu JK, Saito H, Ishikawa Y, Akaza T, Juji T, Takebe Y, Ohishi T, Fukutake K, Maruyama Y, Yashiki S, Sonoda S, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T.** 1999. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96: 4581-4585
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR.** 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor

accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86: 367-377

**Liu YJ.** 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106: 259-262

**Lu Z, Berson JF, Chen Y, Turner JD, Zhang T, Sharron M, Jenks MH, Wang Z, Kim J, Rucker J, Hoxie JA, Peiper SC, Doms RW.** 1997. Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94: 6426-6431

**Lusso P.** 2006. HIV and the chemokine system: 10 years later. *EMBO J.* 25: 447-456

**Luster AD.** 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* 338: 436-445

**Mack M, Luckow B, Nelson PJ, Cihak J, Simmons G, Clapham PR, Signoret N, Marsh M, Stangassinger M, Borlat F, Wells TN, Schlondorff D, Proudfoot AE.** 1998. Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J. Exp. Med.* 187: 1215-1224

**Maddon PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, Clapham PR, Weiss RA, Axel R.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47: 333-348

**Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, Shibayama S, Sagawa K, Fukushima D, Moravek J, Koyanagi Y, Mitsuya H.** 2004. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J. Virol.* 78: 8654-8662

**Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM.** 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* 151: 673-684

**Martin MP, Dean M, Smith MW, Winkler C, Gerrard B, Michael NL, Lee B, Doms RW, Margolick J, Buchbinder S, Goedert JJ, O'Brien TR, Hilgartner MW, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M.** 1998. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 282: 1907-1911

**Mayer H, van der Ryst E, Saag M, Clotet B, Fatkenheuer G, Clumeck N, Turner K, Goodrich JM** 2006 Safety and Efficacy of MARAVIROC, a Novel CCR5 Antagonist, When Used in Combination with Optimized Background Therapy for the Treatment of Antiretroviral-Experienced Subjects Infected with Dual/Mixed-Tropic HIV-1: 24-Week Results of a Phase 2b Exploratory Trial. International AIDS Conference, Toronto, Canada. Abstract THLB0215

**McDermott DH, Beecroft MJ, Kleeberger CA, Al-Sharif FM, Ollier WE, Zimmerman PA, Boatman BA, Leitman SF, Detels R, Hajeer AH, Murphy PM.** 2000. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* 14: 2671-2678

**McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM.** 1998. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 352: 866-870

**McDonald D, Wu L, Bohks SM, Kewalramani VN, Unutmaz D, Hope TJ.** 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300: 1295-1297

**McDougal JS, Kennedy MS, Slish JM, Cort SP, Mawle A, Nicholson JK.** 1986. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 231: 382-385

**McIlroy D, Autran B, Cheynier R, Wain-Hobson S, Clauvel JP, Oksenhendler E, Debre P, Hosmalin A.** 1995. Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Virol.* 69: 4737-4745

**McLellan AD, Sorg RV, Williams LA, Hart DN.** 1996. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.* 26: 1204-1210

**McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DN.** 1995. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur. J. Immunol.* 25: 2064-2068

**McNearney T, Hornickova Z, Markham R, Birdwell A, Arens M, Saah A, Ratner L.** 1992. Relationship of human immunodeficiency virus type 1 sequence heterogeneity to stage of disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89: 10247-10251

**Melendez-Guerrero LM, Arroyo MA, Vega ME, Jimenez E, Hillyer GV, Cadilla CL.** 2001. Characterization of HIV isolates from Puerto Rican maternal-infant pairs reveal predominance of non-syncytium inducing (NSI) variants with CCR5 genotype. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 47 Online Pub: OL39-OL47

**Mellman I, Turley SJ, Steinman RM.** 1998. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol.* 8: 231-237

**Meng G, Wei X, Wu X, Sellers MT, Decker JM, Moldoveanu Z, Orenstein JM, Graham MF, Kappes JC, Mestecky J, Shaw GM, Smith PD.** 2002. Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nat. Med.* 8: 150-156

**Messmer D, Ignatius R, Santisteban C, Steinman RM, Pope M.** 2000. The decreased replicative capacity of simian immunodeficiency virus SIVmac239Delta(nef) is manifest in cultures of immature dendritic cells and T cells. *J. Virol.* 74: 2406-2413

**Michael NL, Nelson JA, Kewalramani VN, Chang G, O'Brien SJ, Mascola JR, Volsky B, Louder M, White GC, Littman DR, Swanstrom R, O'Brien TR.** 1998. Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta32. *J. Virol.* 72: 6040-6047

**Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K.** 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J. Biol. Chem.* 276: 28939-28945

**Mondor I, Ugolini S, Sattentau QJ.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J. Virol.* 72: 3623-3634

**Moore BB, Keane MP, Addison CL, Arenberg DA, Strieter RM.** 1998. CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J. Investig. Med.* 46: 113-120

**Moris A, Nobile C, Buseyne F, Porrot F, Abastado JP, Schwartz O.** 2004. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation. *Blood* 103: 2648-2654

**Morner A, Bjorndal A, Albert J, Kewalramani VN, Littman DR, Inoue R, Thorstensson R, Fenyó EM, Bjorling E.** 1999. Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates, like HIV-1 isolates, frequently use CCR5 but show promiscuity in coreceptor usage. *J. Virol.* 73: 2343-2349

**Moser B, Willmann K.** 2004. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann. Rheum. Dis.* 63 Suppl 2: ii84-ii89

**Mosier DE, Picchio GR, Gulizia RJ, Sabbe R, Poignard P, Picard L, Offord RE, Thompson DA, Wilken J.** 1999. Highly potent RANTES analogues either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type 1 infection in vivo or rapidly select for CXCR4-using variants. *J. Virol.* 73: 3544-3550

**Murakami T, Cardones AR, Hwang ST.** 2004. Chemokine receptors and melanoma metastasis. *J. Dermatol. Sci.* 36: 71-78

**Murakami T, Nakajima T, Koyanagi Y, Tachibana K, Fujii N, Tamamura H, Yoshida N, Waki M, Matsumoto A, Yoshie O, Kishimoto T, Yamamoto N, Nagasawa T.** 1997. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 186: 1389-1393

**Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA.** 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52: 145-176

**Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N, Taguchi H, Hitani A, Kawana-Tachikawa A, Fukushima M, Yamada K, Sugiura W, Oka SI, Ajisawa A, Sato**

**H, Takebe Y, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T.** 2000. Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J. Virol.* 74: 5452-5459

**Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan GH, Richmond A.** 2005. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16: 637-658

**Nguyen DG, Hildreth JE.** 2003. Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur. J. Immunol.* 33: 483-493

**Nobile C, Petit C, Moris A, Skrabal K, Abastado JP, Mammano F, Schwartz O.** 2005. Covert human immunodeficiency virus replication in dendritic cells and in DC-SIGN-expressing cells promotes long-term transmission to lymphocytes. *J. Virol.* 79: 5386-5399

**Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, renzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B.** 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382: 833-835

**Ometto L, Zanotto C, Maccabruni A, Caselli D, Truscia D, Giaquinto C, Ruga E, Chieco-Bianchi L, De RA.** 1995. Viral phenotype and host-cell susceptibility to HIV-1 infection as risk factors for mother-to-child HIV-1 transmission. *AIDS* 9: 427-434

**Pablos JL, Amara A, Bouloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, Delaunay T, Virelizier JL, renzana-Seisdedos F.** 1999. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am. J. Pathol.* 155: 1577-1586

**Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D.** 1997. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387: 611-617

**Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP, Fauci AS.** 1991. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88: 9838-9842

**Pasquier C, Cayrou C, Blancher A, Tourne-Petheil C, Berrebi A, Tricoire J, Puel J, Izopet J.** 1998. Molecular evidence for mother-to-child transmission of multiple variants by analysis of RNA and DNA sequences of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72: 8493-8501

**Pastore C, Picchio GR, Galimi F, Fish R, Hartley O, Offord RE, Mosier DE.** 2003. Two mechanisms for human immunodeficiency virus type 1 inhibition by N-terminal modifications of RANTES. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 509-517

**Patterson S, Knight SC.** 1987. Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* 68 ( Pt 4): 1177-1181



**Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F.** 2001. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J. Virol.* 75: 6710-6713

**Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, Padian N, Braun JF, Kotler DP, Wolinsky SM, Koup RA.** 1996. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat. Med.* 2: 412-417

**Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D.** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90: 8392-8396

**Pease JE, Williams TJ.** 2006. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 1: S212-S221

**Piguet V, Blauvelt A.** 2002. Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. *J. Invest Dermatol.* 119: 365-369

**Pillai S, Good B, Richman D, Corbeil J.** 2003. A new perspective on V3 phenotype prediction. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19: 145-149

**Piot P, Quinn TC, Taelman H, Feinsod FM, Minlangu KB, Wobin O, Mbendi N, Mazebo P, Ndangi K, Stevens W, et al.** 1984. Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet* 2: 65-69

**Pitchenik AE, Fischl MA, Spira TJ.** 1983. Acquired immune deficiency syndrome in low-risk patients. Evidence for possible transmission by an asymptomatic carrier. *JAMA* 250: 1310-1312

**Pohlmann S, Baribaud F, Lee B, Leslie GJ, Sanchez MD, Hiebenthal-Millow K, Munch J, Kirchhoff F, Doms RW.** 2001. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 75: 4664-4672

**Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, Chen Z, Leslie GJ, Lin G, Granelli-Piperno A, Doms RW, Rice CM, McKeating JA.** 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* 77: 4070-4080

**Pollakis G, Abebe A, Kliphuis A, Chalaby MI, Bakker M, Mengistu Y, Brouwer M, Goudsmit J, Schuitemaker H, Paxton WA.** 2004. Phenotypic and genotypic comparisons of CCR5- and CXCR4-tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 biological clones isolated from subtype C-infected individuals. *J. Virol.* 78: 2841-2852

**Pollakis G, Kang S, Kliphuis A, Chalaby MI, Goudsmit J, Paxton WA.** 2001. N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J. Biol. Chem.* 276: 13433-13441

**Polo S, Nardese V, De SC, Arcelloni C, Paroni R, Sironi F, Verani A, Rizzi M, Bolognesi M, Lusso P.** 2000. Enhancement of the HIV-1 inhibitory activity of RANTES by modification of the N-terminal region: dissociation from CCR5 activation. *Eur. J. Immunol.* 30: 3190-3198

**Pope M, Betjes MG, Romani N, Hirmand H, Cameron PU, Hoffman L, Gezelter S, Schuler G, Steinman RM.** 1994. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 78: 389-398

**Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC.** 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500

**Pratt RD, Shapiro JF, McKinney N, Kwok S, Spector SA.** 1995. Virologic characterization of primary human immunodeficiency virus type 1 infection in a health care worker following needlestick injury. *J. Infect. Dis.* 172: 851-854

**Princen K, Hatse S, Vermeire K, Aquaro S, de CE, Gerlach LO, Rosenkilde M, Schwartz TW, Skerlj R, Bridger G, Schols D.** 2004. Inhibition of human immunodeficiency virus replication by a dual CCR5/CXCR4 antagonist. *J. Virol.* 78: 12996-13006

**Quillent C, Oberlin E, Braun J, Rousset D, Gonzalez-Canali G, Metais P, Montagnier L, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Beretta A.** 1998. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 351: 14-18

**Ragni MV, Lewis JH, Spero JA, Bontempo FA.** 1983. Acquired-immunodeficiency-like syndrome in two haemophiliacs. *Lancet* 1: 213-214

**Reeves JD, Schulz TF.** 1997. The CD4-independent tropism of human immunodeficiency virus type 2 involves several regions of the envelope protein and correlates with a reduced activation threshold for envelope-mediated fusion. *J. Virol.* 71: 1453-1465

**Resch W, Hoffman N, Swanstrom R.** 2001. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology* 288: 51-62

**Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J.** 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280: 1949-1953

**Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD.** 1999. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29: 2769-2778

**Rollins BJ.** 1997. Chemokines. *Blood* 90: 909-928

**Roos MT, Lange JM, de Goede RE, Coutinho RA, Schellekens PT, Miedema F, Tersmette M.** 1992. Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.* 165: 427-432

**Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD.** 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278: 1447-1450

**Rot A, von Andrian UH.** 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 891-928

**Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ.** 1999. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: In vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1alpha. *Am. J. Pathol.* 154: 1125-1135

**Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A.** 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182: 389-400

**Sanchez-Pescador R, Power MD, Barr PJ, Steimer KS, Stempien MM, Brown-Shimer SL, Gee WW, Renard A, Randolph A, Levy JA, et al.** 1985. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* 227: 484-492

**Sanders RW, de Jong EC, Baldwin CE, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML, Berkhout B.** 2002. Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J. Virol.* 76: 7812-7821

**Sattentau QJ, Moore JP.** 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* 174: 407-415

**Scarlatti G, Hodara V, Rossi P, Muggiasca L, Bucceri A, Albert J, Fenyo EM.** 1993. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from mother to child correlates with viral phenotype. *Virology* 197: 624-629

**Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G.** 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19: 621-626

**Schols D.** 2004. HIV co-receptors as targets for antiviral therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 4: 883-893

**Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M.** 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression

of disease is associated with a shift from monocytoprotropic to T-cell-tropic virus population. *J. Virol.* 66: 1354-1360

**Schutten M, van Baalen CA, Guillon C, Huisman RC, Boers PH, Sintnicolaas K, Gruters RA, Osterhaus AD.** 2001. Macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 facilitates in vivo escape from cytotoxic T-lymphocyte pressure. *J. Virol.* 75: 2706-2709

**Shen DM, Shu M, Willoughby CA, Shah S, Lynch CL, Hale JJ, Mills SG, Chapman KT, Malkowitz L, Springer MS, Gould SL, DeMartino JA, Siciliano SJ, Lyons K, Pivnichny JV, Kwei GY, Carella A, Carver G, Holmes K, Schleif WA, Danzeisen R, Hazuda D, Kessler J, Lineberger J, Miller MD, Emini EA.** 2004. Antagonists of human CCR5 receptor containing 4-(pyrazolyl)piperidine side chains. Part 2: Discovery of potent, selective, and orally bioavailable compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 941-945

**Shenoy SK, Lefkowitz RJ.** 2003. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J.* 375: 503-515

**Shenoy SK, Lefkowitz RJ.** 2005. Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. *Sci. STKE.* 2005: cm10

**Shimizu N, Haraguchi Y, Takeuchi Y, Soda Y, Kanbe K, Hoshino H.** 1999. Changes in and discrepancies between cell tropisms and coreceptor uses of human immunodeficiency virus type 1 induced by single point mutations at the V3 tip of the env protein. *Virology* 259: 324-333

**Siegel FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ.** 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284: 1835-1837

**Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Buser R, Wells TN, Proudfoot AE.** 1997. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 276: 276-279

**Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, Harrigan PR.** 2007. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J. Clin. Microbiol.* 45: 279-284

**Smith DH, Byrn RA, Marsters SA, Gregory T, Groopman JE, Capon DJ.** 1987. Blocking of HIV-1 infectivity by a soluble, secreted form of the CD4 antigen. *Science* 238: 1704-1707

**Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ.** 1997. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Hemophilia Growth and Development*

Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 277: 959-965

**Smyth RJ, Yi Y, Singh A, Collman RG.** 1998. Determinants of entry cofactor utilization and tropism in a dualtropic human immunodeficiency virus type 1 primary isolate. *J. Virol.* 72: 4478-4484

**Sol-Foulon N, Moris A, Nobile C, Boccaccio C, Engering A, Abastado JP, Heard JM, van Kooyk Y., Schwartz O.** 2002. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity.* 16: 145-155

**Spijkerman IJ, Koot M, Prins M, Keet IP, van den Hoek AJ, Miedema F, Coutinho RA.** 1995. Lower prevalence and incidence of HIV-1 syncytium-inducing phenotype among injecting drug users compared with homosexual men. *AIDS* 9: 1085-1092

**Spudich SS, Huang W, Nilsson AC, Petropoulos CJ, Liegler TJ, Whitcomb JM, Price RW.** 2005. HIV-1 chemokine coreceptor utilization in paired cerebrospinal fluid and plasma samples: a survey of subjects with viremia. *J. Infect. Dis.* 191: 890-898

**Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC.** 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 45: 637-648

**Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K.** 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 191: 411-416

**Strizki JM, Xu S, Wagner NE, Wojcik L, Liu J, Hou Y, Endres M, Palani A, Shapiro S, Clader JW, Greenlee WJ, Tagat JR, McCombie S, Cox K, Fawzi AB, Chou CC, Pugliese-Sivo C, Davies L, Moreno ME, Ho DD, Trkola A, Stoddart CA, Moore JP, Reyes GR, Baroudy BM.** 2001. SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98: 12718-12723

**Sullivan N, Sun Y, Sattentau Q, Thali M, Wu D, Denisova G, Gershoni J, Robinson J, Moore J, Sodroski J.** 1998. CD4-Induced conformational changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. *J. Virol.* 72: 4694-4703

**Suresh P, Wanchu A.** 2006. Chemokines and chemokine receptors in HIV infection: role in pathogenesis and therapeutics. *J. Postgrad. Med.* 52: 210-217

**Tagat JR, McCombie SW, Nazareno D, Labroli MA, Xiao Y, Steensma RW, Strizki JM, Baroudy BM, Cox K, Lachowicz J, Varty G, Watkins R.** 2004. Piperazine-based CCR5 antagonists as HIV-1 inhibitors. IV. Discovery of 1-[(4,6-dimethyl-5-pyrimidinyl)carbonyl]-4-[4-[2-methoxy-1(R)-4-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl-3(S)-methyl-1-piperaz inyl]-4-

methylpiperidine (Sch-417690/Sch-D), a potent, highly selective, and orally bioavailable CCR5 antagonist. *J. Med. Chem.* 47: 2405-2408

**Takashima K, Miyake H, Kanzaki N, Tagawa Y, Wang X, Sugihara Y, Iizawa Y, Baba M.** 2005. Highly potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by TAK-220, an orally bioavailable small-molecule CCR5 antagonist. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 3474-3482

**Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA.** 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 197: 823-829

**Tersmette M, de Goede RE, Al BJ, Winkel IN, Gruters RA, Cuypers HT, Huisman HG, Miedema F.** 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J. Virol.* 62: 2026-2032

**Tersmette M, Gruters RA, De WF, de Goede RE, Lange JM, Schellekens PT, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F.** 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J. Virol.* 63: 2118-2125

**Thali M, Moore JP, Furman C, Charles M, Ho DD, Robinson J, Sodroski J.** 1993. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J. Virol.* 67: 3978-3988

**Theodorou I, Meyer L, Magierowska M, Katlama C, Rouzioux C.** 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group. *Lancet* 349: 1219-1220

**Thiry L, Sprecher-Goldberger S, Jonckheer T, Levy J, Van de Perre P., Henrivaux P, Cogniaux-LeClerc J, Clumeck N.** 1985. Isolation of AIDS virus from cell-free breast milk of three healthy virus carriers. *Lancet* 2: 891-892

**Trauneker A, Luke W, Karjalainen K.** 1988. Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1. *Nature* 331: 84-86

**Trkola A, Ketas TJ, Nagashima KA, Zhao L, Cilliers T, Morris L, Moore JP, Maddon PJ, Olson WC.** 2001. Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J. Virol.* 75: 579-588

**Trouplin V, Salvatori F, Cappello F, Obry V, Brelot A, Heveker N, Alizon M, Scarlatti G, Clavel F, Mammano F.** 2001. Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay. *J. Virol.* 75: 251-259

- Trumpfheller C, Park CG, Finke J, Steinman RM, Granelli-Piperno A.** 2003. Cell type-dependent retention and transmission of HIV-1 by DC-SIGN. *Int. Immunol.* 15: 289-298
- Tschachler E, Groh V, Popovic M, Mann DL, Konrad K, Safai B, Eron L, diMarzo VF, Wolff K, Stingl G.** 1987. Epidermal Langerhans cells--a target for HTLV-III/LAV infection. *J. Invest Dermatol.* 88: 233-237
- Tscherning C, Alaeus A, Fredriksson R, Bjorndal A, Deng H, Littman DR, Fenyo EM, Albert J.** 1998. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* 241: 181-188
- Turville SG, Santos JJ, Frank I, Cameron PU, Wilkinson J, Miranda-Saksena M, Dable J, Stossel H, Romani N, Piatak M, Jr., Lifson JD, Pope M, Cunningham AL.** 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 103: 2170-2179
- Ugolini S, Mondor I, Sattentau QJ.** 1999. HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol.* 7: 144-149
- Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T.** 2004. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24: 34-40
- Unutmaz D, Kewalramani VN, Marmon S, Littman DR.** 1999. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 189: 1735-1746
- Valentin A, Lu W, Rosati M, Schneider R, Albert J, Karlsson A, Pavlakis GN.** 1998. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95: 8886-8891
- Valladeau J, Duvert-Frances V, Pin JJ, Zutter-Dambuyant C, Vincent C, Massacrier C, Vincent J, Yoneda K, Banchereau J, Caux C, Davoust J, Saeland S.** 1999. The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of Langerhans cells, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur. J. Immunol.* 29: 2695-2704
- van Baelen K, Vandenbroucke I, Rondelez E, Van Eygen V, Vermeiren H, Stuyver LJ.** 2007. HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays. *J. Virol. Methods*
- van Kooyk Y, Geijtenbeek TB.** 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 697-709
- van Rij RP, Broersen S, Goudsmit J, Coutinho RA, Schuitemaker H.** 1998. The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS* 12: F85-F90

**Van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, brecht-van LN, Scherpbier HJ, Veenstra J, Boer K, Coutinho RA, Miedema F, Schuitemaker H.** 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J. Clin. Invest* 94: 2060-2067

**Verrier F, Borman AM, Brand D, Girard M.** 1999. Role of the HIV type 1 glycoprotein 120 V3 loop in determining coreceptor usage. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15: 731-743

**Wade CM, Lobidel D, Brown AJ.** 1998. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 env and gag sequence variants derived from a mother and two vertically infected children provides evidence for the transmission of multiple sequence variants. *J. Gen. Virol.* 79 ( Pt 5): 1055-1068

**Walker DK, Abel S, Comby P, Muirhead GJ, Nedderman AN, Smith DA.** 2005. Species differences in the disposition of the CCR5 antagonist, UK-427,857, a new potential treatment for HIV. *Drug Metab Dispos.* 33: 587-595

**Wang WK, Chen MY, Chuang CY, Jeang KT, Huang LM.** 2000. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 33: 131-140

**Ward SG, Westwick J.** 1998. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem. J.* 333 ( Pt 3): 457-470

**Weis WI, Taylor ME, Drickamer K.** 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* 163: 19-34

**Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387: 426-430

**Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, James IT, Jenkins TM, Perros M, van der Ryst E.** 2006. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J. Virol.* 80: 4909-4920

**Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, Chappey C, Kiss LD, Paxinos EE, Petropoulos CJ.** 2007. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 566-575

**Wild C, Greenwell T, Matthews T.** 1993. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9: 1051-1053

**Wilflingseder D, Banki Z, Dierich MP, Stoiber H.** 2005. Mechanisms promoting dendritic cell-mediated transmission of HIV. *Mol. Immunol.* 42: 229-237



**Winkler C, Modi W, Smith MW, Nelson GW, Wu X, Carrington M, Dean M, Honjo T, Tashiro K, Yabe D, Buchbinder S, Vittinghoff E, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Detels R, Donfield S, Willoughby A, Gomperts E, Vlahov D, Phair J, O'Brien SJ.** 1998. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* 279: 389-393

**Wofsy CB, Cohen JB, Hauer LB, Padian NS, Michaelis BA, Evans LA, Levy JA.** 1986. Isolation of AIDS-associated retrovirus from genital secretions of women with antibodies to the virus. *Lancet* 1: 527-529

**Wolfs TF, Zwart G, Bakker M, Goudsmit J.** 1992. HIV-1 genomic RNA diversification following sexual and parenteral virus transmission. *Virology* 189: 103-110

**Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N, Choe H, Sodroski J, Newman W, Koup RA, Mackay CR.** 1997. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J. Exp. Med.* 185: 1681-1691

**Wyatt R, Sodroski J.** 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280: 1884-1888

**Yang ZY, Huang Y, Ganesh L, Leung K, Kong WP, Schwartz O, Subbarao K, Nabel GJ.** 2004. pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. *J. Virol.* 78: 5642-5650

**Yoshida T, Imai T, Takagi S, Nishimura M, Ishikawa I, Yaoi T, Yoshie O.** 1996. Structure and expression of two highly related genes encoding SCM-1/human lymphotactin. *FEBS Lett.* 395: 82-88

**Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H.** 1997. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat. Med.* 3: 1369-1375

**Zerhouni B, Nelson JA, Saha K.** 2004. Isolation of CD4-independent primary human immunodeficiency virus type 1 isolates that are syncytium inducing and acutely cytopathic for CD8+ lymphocytes. *J. Virol.* 78: 1243-1255

**Zhang LQ, MacKenzie P, Cleland A, Holmes EC, Brown AJ, Simmonds P.** 1993. Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J. Virol.* 67: 3345-3356

**Zhang YJ, Moore JP.** 1999. Will multiple coreceptors need to be targeted by inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry? *J. Virol.* 73: 3443-3448

**Zhou LJ, Tedder TF.** 1995. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood* 86: 3295-3301

**Zhu T, Wang N, Carr A, Nam DS, Moor-Jankowski R, Cooper DA, Ho DD.** 1996. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J. Virol.* 70: 3098-3107

**Zlotnik A, Yoshie O.** 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12: 121-127