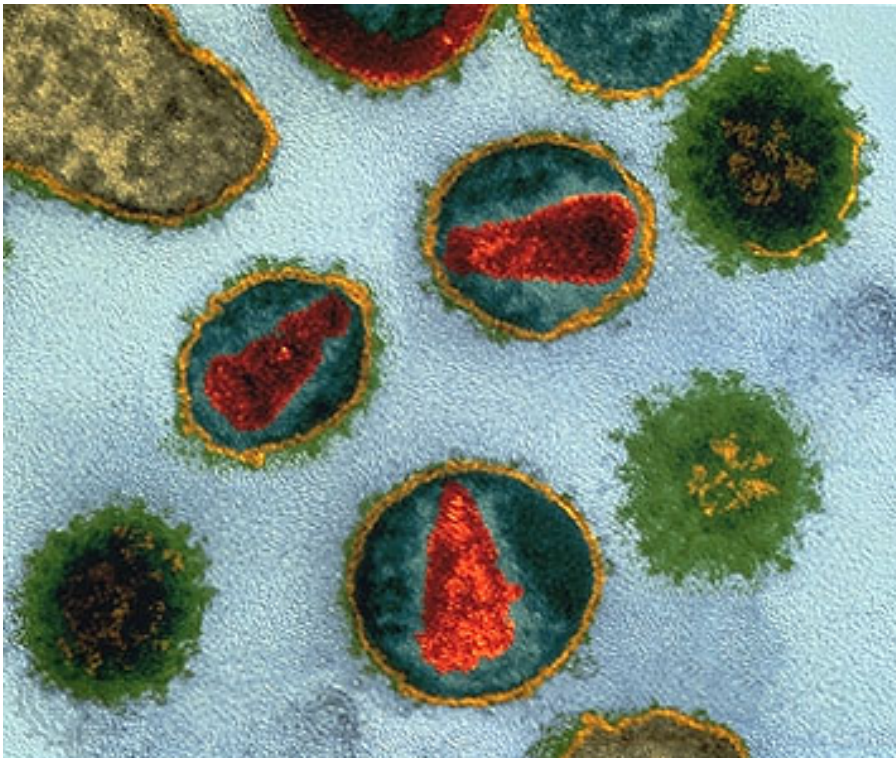




UPPSALA
UNIVERSITET

Den mystiska smittan från Afrikas djungel

HIV - biologin bakom ett komplext immunbristvirus



Katja Södergren

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2012
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

HIV är förkortningen för det humana immunbristsviruset (human immunodeficiency virus) och är orsaken till AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). AIDS är samlingsnamnet för de sjukdomar som till slut drabbar en HIV-smittad individ. De är ofta opportunistiska sjukdomar. Opportunistiska infektioner orsakas av mikroorganismer som normalt sett kan tas omhand av immunförsvaret men då immunförsvaret är kraftigt reducerat blir dessa infektioner patogena. Då HIV attackerar vårt immunförsvaret och sakta bryter ner det finns det tillslut inget motstånd mot dessa vanligtvis hanterbara infektioner. Idag lever mer än 33 miljoner människor med HIV och hittills i världen har 25 miljoner människor dödats av infektionen. En pandemi råder och det är viktigt att smittan tas under kontroll. Färre människor smittas idag än för 5 år sedan och många lever länge med mediciner, som kan förlänga livet med upp emot 20 år. Det pågår ständigt forskning kring nya sätt att hantera infektionen, från bromsmedicin till vaccin. Viktigt är också att informera om hur man skyddar sig. För idag finns inga botemedel mot detta dödliga virus. Forskningen har tagit fram mycket goda men inte helt fulländade modellorganismer att studera på. Rhesusapan (*Macaca mulatta*) kan smittas med en motsvarighet till HIV som smittar apor, kallad SIV (simian immunodeficiency virus), och utvecklar då AIDS-liknande symptom. Den är en vanlig modell då den har liknande cellulär uppbyggnad och precis som människan inte är en naturlig värd för immunbristsviruset. Från rhesusapan har man lyckats identifiera vilka immunceller som är målet för viruset och var de är vanligast förekommande. De celler som har identifierats vara främst utsatta för infektionen är $CD4^+CCR5^+$ minnes-T-celler. Dessa celler finns i hela kroppen men är mycket vanliga i mag- och tarmkanalen. Då dessa celler elimineras till färre än 200/ μ L blod utvecklar individen oftast AIDS.

HIV:s ursprung har visats sig komma ifrån just apor. Taxonomiska studier har gjorts på grupper och subtyper av HIV och jämfört dessa med olika typer av SIV. På så vis sett att HIV och SIV är relaterade med varandra. Idag delas HIV in i två grupper, HIV-1 och HIV-2. HIV-1 är den pandemiska varianten medan HIV-2 är relativt ovanlig. HIV-1 verkar komma ifrån Centralschimpanzen (*Pan troglodytes troglodytes*) som naturligt smittas med ett typ av SIV som genetiskt sett är mycket lik HIV-1. HIV-2 är nära besläktat med ett SIV som förekommer hos apan *Cerocebus atys*.

Lovande forskning kring antimikrobiella peptider från det medfödda försvaret pågår. Peptiderna kallas för defensiner och finns hos många vertebrater. En typ av protein har hittats hos rhesusapan som är liten och cirkulär. De kallas på grund av sin struktur för θ -defensiner och har mycket potent antimikrobiell verkan mot bakterier och svampar. θ -defensiner finns ej naturligt uttryckta i människokroppen men då man fann en pseudogen för detta protein kunde man återskapa peptiden så som den skulle ha sett ut ifall den mänskliga genen var funktionell. Man kallade produkten för retrocyklin. Retrocyklin hade goda antivirala egenskaper och skyddande celler *in vitro* från infektion av alla typer av HIV-1. Då mänskliga epitelceller har vertygen som krävs för att producera retrocyklin och att kroppen accepterar dessa framställda peptider, gör retrocyklin till en god kandidat för fortsatt forskning kring dess potentiella roll i bekämpningen av HIV och AIDS.

Inledning

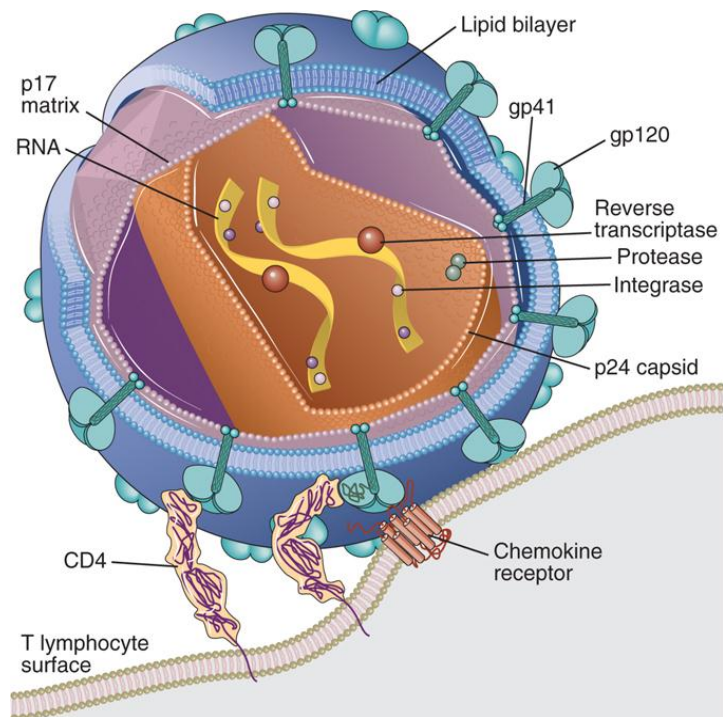
HIV är det humana immunbristsvirus som leder till sjukdomen AIDS. HIV och AIDS är idag ett

utbredd och globalt samhällsproblem. År 2009 levde 33,3 miljoner människor med HIV och 68% av dessa bodde i Afrika, söder om Saharaöknen (UNAIDS 2010). Idag pågår forskning kring hur man ska kunna hålla spridningen i schack, motverka och behandla de sjuka. Många studier har gjorts för att fastställa virusets ursprung, hur det är uppbyggt och fungerar rent mekaniskt. Från att det först upptäcktes i början på 1980-talet har 25 miljoner människor mist livet (UNAIDS 2010). HIV är ett framgångsrikt virus som har specialiserat sig på vårt immunförsvar. Genom att studera naturligt immuna individer och titta på närbesläktade arter och deras symbios med likande virus, kan man kanske få en viktig insikt i hur man ska rikta forskningen om HIV och AIDS. Vissa apor kan smittas med immunbristvirus men lyckas tygla infektionen och inte utveckla AIDS. Hur fungerar det? Och vad kan vi lära av det? Som del i det medfödda immunförsvaret hos många vertebrater ingår antimikrobiella proteiner som oskadliggör bakterier, virus och svampinfektioner. Dessa proteiner kallas för defensiner och finns i olika varianter. Kan vi använda oss av dessa i större utsträckning och utveckla dem till mer potenta vapen i kampen mot HIV?

Syftet med detta arbete är att fördjupa mig i ämnet HIV/AIDS, dess verkningsmekanismer och utveckling. Jag vill även undersöka defensiner och dess potentiella användningsområden som förebyggande eller behandlande mediciner.

Vad är HIV?

HIV är ett retrovirus. Retrovirus är unika då de transkriberar sitt RNA till cDNA och integrerar det i värdens genom (van der Kuyt 2012). Där kan det sitta latent i flera år utan att transkriberas (Abbas *et al.* 2012). Under människans livstid har vi vid flera tillfällen infekterats med olika retrovirus. Hela 8% av det mänskliga genomet utgörs av sekvenser från retrovirus (Landers *et al.* 2001, Engelman *et al.* 2012). Retrovirus har alla ett yttre lipidlager med virala glycoprotein och ett genom bestående av två kopior linjärt, enkelstängat RNA (Abbas *et al.* 2012). HIV virionen har en sfärisk struktur med det inne-slutande lipidlagret som härstammar ifrån den infekterade cellen (Figur. 1). Viruspartikeln får detta lipidlager i samband med syntetisering av nya virus som knoppas av från värdcellen. Viruset tillverkar två glycoprotein, gp120 och gp41, som ankrar sig i lipidlagret. Dessa proteiner binder till varandra och bildar en domän som är viktig för virusets förmåga att äntra celler (Abbas *et al.*



Figur 1. HIV-virionens struktur. Denna bild publicerades i Cellular and molecular immunology, 7:e upplagan, Abbas A.K, Lichtman A.H och Pillai S, Congenital and acquired immunodeficiencies, pp 459, Copyright Elsevier (2012).

2012) Innanför lipidlagret ligger kapsiden som innesluter virusets RNA (NIAID, 2012).

Retrovirus har tre gener som kodar för dess struktur. De kallas *gag*, *pol* och *env*. Virusets RNA transkriberas till DNA med hjälp av omvänt transkriptas och integreras i värdens genom med hjälp av integras (Katz & Skalka 1994, Swanson & Malim. 2008). De kodande delarna för omvänt transkriptas och integras finns belägna i *pol* genen, precis som enzymet proteas. Vidare använder sig viruset av värdcellens polymeras för att transkribera sitt integrerade DNA till ett mRNA, som translateras till det polyprotein som i slutändan ger upphov till en ny viruspartikel. Polyproteinet klyvs till flera mindre protein med ett proteas som även det är en del av polyproteinet (Katz & Skalka 1994). Detta proteas är en zymogen. En zymogen är ett inaktivt enzym som aktiveras av olika fysiologiska faktorer, t ex genom att peptidbindningar bryts och det aktiva sätet öppnas upp (Neurath & Walsh 1976).

När Pol och Gag klyvs görs det med ett proteas som viruset själv tillverkar, medan Env klyvs av ett av cellens egna proteas. Pol klyvs till enzymen omvänt transkriptas, integras och proteas (van der Kuyt 2012). Gag bildar proteinerna till den så kallade kapsiden, som innesluter virusets genom. Env blir slutligen de virala glycoprotein (gp120 och gp41) som lokaliserar till det inneslutade lipidlagret (Coffin *et al.* 1997).

Retrovirus har en hög mutationshastighet på grund av omvänt transkriptas, som är benägen att ofta göra fel då den saknar proof reading. Dessutom saknar även värdens RNA polymeras egenskapen av proof reading. Detta ger en stor variation på virusen som gör att de selekteras och utvecklas för att, i fallet HIV, undkomma till immunförsvarets skydd (Katz & Skalka 1994).

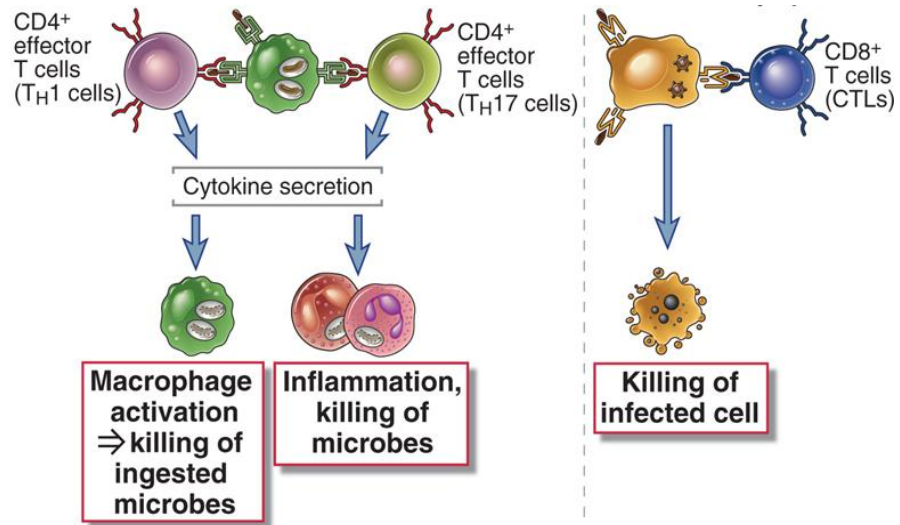
Retrovirus delas upp i två stora grupper, enkla och komplexa. Vad som skiljer dessa åt är strukturen på deras genom. De komplexa retrovirusen kodar för ytterligare proteiner exempelvis nef, vpu, vpr och vif. De flesta av dessa ansamlas inte i den färdiga virionen utan assisterar byggnaden av dem inifrån cellen. Dock har man visat på två proteiner som finns i större mängder inuti virioner; vpr (alla primatlentivirus) och vpx (endast SIV). Det finns tre subtyper (av totalt 7) retrovirus som är komplexa, en av dem är lentivirus.

Infektion

Vårt immunförsvaret består av olika celler med olika funktioner för att skydda vår kropp mot patogener. Man brukar tala om "first line of defense" och "second line of defense" som man i huvudsak benämner som det medfödda (innate) försvaret och det förvärvade (acquired) försvaret (Abbas *et al.* 2012). Dessa skiljer sig från varandra då det medfödda försvaret till största del består av proteiner som cirkulerar i kroppen med antimikrobiella egenskaper och fagocyter som genom fagocytos tar upp patogenerna och oskadliggör dem. Det förvärvade försvaret består istället av immunceller som kallas lymfocyter. Man skiljer på T-lymfocyter och B-lymfocyter. T-lymfocyter bildas i benmärgen och migrerar sedan till brässen (thymus) där de mognar till funktionella immunceller. B-lymfocyter mognar istället i benmärgen och deras största uppgift är att bilda antikroppar mot inkräktande patogener. T-cellerna delas upp i flera kategorier; T-hälparceller (T_h-celler) som assisterar och aktiverar andra immunceller, så som B-celler, och cytotoxiska T-celler (T_c-celler) som känner igen bland andra infekterade systemiska celler (icke-immunceller) och förstör dem (Figur 2.). Vad som utmärker och skiljer T_h-celler och T_c-celler åt

är den typ av receptor de har. T_H -celler har receptorn CD4 och T_C -celler har receptorn CD8. När lymphocyterna utvecklas i benmärgen har de varken CD4 eller CD8. Då de migrerar till brässen och mognar uttrycker de under en period både CD4 och CD8 och kallas då dubbelt positiva. I slutänden uttrycker de dock endast en av dessa receptorer och får sin slutliga fenotyp (Abbas *et al.* 2012). CD4 och CD8 interagerar med så kallade MHC-molekyler (major histocompatibility complex) som sitter i membranet på alla celler i kroppen. MHC-molekylerna visar upp fragment av proteiner från sitt inre för omgivningen. Cellerna visar dessa proteiner framförallt för andra immunceller som cirkulerar runt och kollar av dem, ifall de är ”egna” eller inte. Om en cell visar upp ett främmande protein, som inte härrör från den egna kroppen, så inleds en immunreaktion. De visar alltså upp för omgivningen vad de har inuti sig. CD4 och CD8 är en av de receptorer som fäster på MHC i denna scannande process (Abbas *et al.* 2012).

När HIV infekterar en cell binder det först, med hjälp av glycoproteinen gp120 och gp41, till T-cellens receptor CD4 och coreceptorerna CCR5/CXCR4. Därefter sker en sammansmältning av virionen med cellemembranet. gp120 och gp41 sitter sedan på värdcellens membran och kan inducera syncytia (en sammansmältning av två celler till en multinukleär cell) med andra icke infekterade celler (Abbas *et al.* 2012).



Figur 2. $CD4^+$ T-celler och $CD8^+$ T-celler. Cellerna orsakar olika immunreaktioner vid aktivering. Denna bild publicerades i Cellular and molecular immunology, 7:e upplagan, Abbas A.K, Lichtman A.H och Pillai S, Effector mechanisms of cell-mediated immunity, s. 226, Copyright Elsevier (2012).

Brenchley *et al.* visade i en studie 2003 att de allra flesta infekterade cellerna tillhör gruppen $CD4^+$ minnes-T-celler. CD4 är ett viktigt verktyg för en lyckad infektion. De flesta av kroppens $CD4^+$ celler förstörs i ett tidigt skede och ett stort antal av dessa finns i mag- och tarmkanalen (Brenchley *et al.* 2004). Många $CD4^+$ minnes-T-celler finns i det intestinala lamina propria. Dessa är de första att bli infekterade av viruset och det snabbt. Viruset förökar sig, som medför en kraftig reduktion av dessa $CD4^+$ minnes-T-celler. Det gör att även koncentrationen av viruset till en början sjunker drastiskt. Dock produceras och rekryteras hela tiden nya lymfocyter till platsen och dessa blir då nya värdceller att infektera. Så kan infektionen fortgå (Veazley *et al.* 1998).

Kemokin receptor 5 (CCR5)

Utöver CD4 är CCR5 den vanligaste coreceptorn som HIV och SIV använder för att ta sig in i och infektera celler. CCR5 är en kemokin receptor. Ett kemokin är en substans som hjälper immunceller att migrera från exempelvis blodet till en inflammerad vävnad (Abbas *et al.* 2012). CD4⁺ celler som uttrycker CCR5 är därför överrepresenterade bland infekterade immunceller.

M-tropisk versus T-tropisk virusstam

Från början klassificerades HIV som M-tropisk eller T-tropisk. Denna uppdelning utgick ifrån virusets förmåga att infektera makrofager och T-celler. M-tropiska virus infekterar främst makrofager och T-tropiska virus infekterar främst CD4⁺ T-celler. Senare visades att T-tropiska stammar bildade syncytia (SI = syncytia inducing) i odödliga MT2-celler. M-tropiska stammar bildade ej syncytia (NSI = non syncytia inducing) (Coakley *et al.* 2005). Syncytia har betydelse då icke infekterade celler smälter samman med infekterade celler och bidrar till minskningen av CD4⁺ celler (Andreau *et al.* 2004). Idag klassificeras stammarna beroende på vilka coreceptorer som används vid infektion. M-tropiska virus (NSI) infekterar med hjälp av coreceptorn CCR5 och dessa virus kallas R5. T-tropiska virus (SI) infekterar med hjälp av coreceptorn CXCR4 och dessa stammar kallas således X4. Det finns även de virus som använder både CCR5 och CXCR4 och dessa kallas R5X4 (Berger *et al.* 1998). De T-tropiska SI-virusen har förknippats med en snabb sjukdomsutveckling och en snabbare minskning av CD4⁺ T-celler (Coakley *et al.* 2005). Chen *et al* visade 1997 att apviruset SIV främst använder sig av CD4⁺ och CCR5 vid infektion. CXCR4 medlade i experimentet inte alls någon infektion av viruset. Då CCR5 är den främsta coreceptorn för infektion med det M-tropiska R5-viruset HIV-1, verkar SIV vara en mycket relevant modell för studier av AIDS (Chen *et al.* 1997).

Vissa individer är som beskrivet naturligt immuna mot HIV-1, dock är detta mycket ovanligt. Då man undersökte två av dessa individer fann man att de var homozygota för en defekt CCR5-gen. Defekten utgjordes av en 32 baspar lång radering. Detta gjorde att proteinet som formade receptorn inte uttrycktes på deras T-celler och hindrade på så sätt infektion av HIV-1 (Liu *et al.* 1996).

Symtom på infektion

Hur visar sig då denna infektion? Symptomen för en akut HIV-infektion visar sig efter 5 till 30 dagar men är vanligast inom 14 dagar från infektionstillfället (Schacker *et al.* 1996). De vanligaste symptomen är feber (>90%), trötthet (90%), viktminkning (~70%), halsont (~70%) och muskelvärk (~60%) (Schacker *et al.* 1996). Andra mer ovanliga symtom är: utslag (förekommer i 40-80% av fallen och syns ofta på bålarna och armarna), svampinfektion i munnen, huvudvärk, svullna lymfkörtlar, ledvärk, retro-orbital smärta (smärta bakom ögonen), depression, nattliga svettningar, sår i munhålan och genitalier och magproblem (Schacker *et al.* 1996, Kahn & Walker 1998). De flesta med en akut HIV-infektion söker läkarvård för sina problem då de är så pass allvarliga. I en testgrupp där alla testpersoner var i riskzonen för att smittas med HIV och sedan fick smittan sökte 95% av dessa sjukvård för sina besvär. Dock var det få som fick rätt diagnos (5%). Symptomen för akut HIV-infektion är något diffusa och lätt kan misstas för andra infektioner, så som körtelfeber och hepatit A och B (Kahn & Walker 1998, Quinn 1997). Det är under den akuta infektionen som koncentration av virus är som högst och smittrisen är som störst (Clark *et al.* 1991).

Minskning av CD4⁺ celler

Ett annat kännetecken för HIV-infektion är en minskning av det totala antalet vita blodkroppar. Det sker en ökning av CD8⁺ T_c-celler samtidigt som halten CD4⁺ T_h-celler minskar (Quinn 1997). I en studie från 2000 inokulerades 6 rhesusapor med SIV_{mac} för att mäta halten intestinala CD4⁺ celler. Resultatet var en mycket kraftig nedgång av dessa celler vid en akut infektion. Inom 14 dagar fanns bara 5-10% intestinala CD4⁺ T-celler kvar, som annars utgör 50-60% av T-cellpopulationen i mag-tarmkanalen (Veazley *et al.* 2000). Den mukosala intestinala lymfvävnaden hos rhesusapor är mycket lik den hos människan (Veazley *et al.* 1998).

HIV-infektionens förlopp

För att ställa en diagnos på en pågående infektion kan en ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) göras. Genom en ELISA kan man bland annat testa för antikroppar mot viruset. Antikroppar tar några veckor att bildas, vanligtvis 22-27 dagar. Därför är det inte lämpligt att endast testa för antikroppar vid diagnostisering av akut HIV-infektion. Vanligast är att man då också testar för p24 eller höga halter virusRNA i blodet. p24 är ett protein från kapsiden där virusets RNA finns. Von Sydow *et al.* visade i en rapport från 1988 att det mycket tidigt i infektionen (från första veckan efter insjuknande) gick att påvisa höga halter p24 i blodet när inga antikroppar kunde detekteras. Från andra och tredje veckan efter insjuknande kunde man börja se en minskning av p24. Från vecka 4-13 var halten p24 så låg att den ej gick att påvisa och fortsatte ligga lågt men detekterades stundtals under resten av året. Antikroppar kunde dock alltid detekteras under slutet av första året efter insjuknande. Anledningen till att halten p24 gradvis sjunker kan bero på immunologiska effekter, så som komplexbildning av antikroppar och antigen (virus). Detta kan delvis styrkas med det faktum att koncentrationen p24 sjunker i samband med att koncentrationen antikroppar stiger (von Sydow 1988). ELISA-tester görs på allt blod som doneras (Kahn & Walker 1998). Hög koncentration av p24 står i direkt korrelation till hur mycket virus det finns i blodet. Utvecklingen till AIDS har visat sig gå snabbare om man har höga halter virus-RNA i blodet. Det är säkrast att samtidigt undersöka halten CD4⁺ T-celler och hur snabbt den minskar för att göra en så korrekt bedömning av sjukdomsutvecklingen som möjligt (Mellors *et al.* 1997).

Diagnos

De höga halterna RNA gör det svårt för kroppen att återställa balansen av de förstörda CD4⁺ cellerna. Lymfvävnad förstörs på grund av infektionen, som medför en markant försämring av dess funktioner. Den kraftiga minskningen av viruset visar att immunförsvaret till en början med goda resultat får bukt på infektionen. Viruset kan dock inte helt elimineras och immunförsvaret kan ej fungera fullständigt (Quinn *et al.* 1997).

En utmärkande faktor för HIV-infektion är den kroniska aktiveringen av immunförsvaret och en stadig minskning av CD4⁺ celler. Det är när mängden CD4⁺ celler sjunker under 200 per μ L blod som man vanligvis utvecklar AIDS (Levy 1993), då kroppen har för få CD4⁺ celler för att motstå infektioner.

Det humana immunbristvirusets evolution

Det humana immunbristviruset, HIV, hör till gruppen lentivirus. I gruppen ingår även bland annat apviruset SIV (simian immunodeficiency virus), kattviruset FIV (feline immunodeficiency virus), och det immunbristvirus som infekterar oxdjur (Girard *et al.* 2011).

HIV-1 och HIV-2

HIV finns idag i två former, HIV-1 och HIV-2. HIV-1 har förmodligen överförts till människan från schimpanser i Västafrika och HIV-2 från en apa tillhörande släktet markattartade apor (*Cercocebus atys*) (Hirsch *et al.* 1989, Gao *et al.* 1999). Vidare delas HIV-1 in i 4 grupper: M, N, O och P. M står för major/main och är den grupp virus som dominerar i världen idag (Charneau *et al.* 1994, Girard *et al.* 2011). Grupp O (outgroup/outlier) beskrevs på tidigt 90-tal och förekomsten är låg (Charneau *et al.* 1994, Gurtler *et al.* 1994, Peeters *et al.* 1997). Grupp N förekommer i ännu lägre utsträckning då endast 13 fall har beskrivits sedan 1995. Alla kända fall har kommit ifrån Kamerun där grupp N står för 0,1% av infektionerna i landet (Vallari *et al.* 2010). Grupp P är mycket ovanlig och har hittills bara hittats i enstaka individer från Kamerun (Vallari *et al.* 2011). Kategoriseringen i olika undergrupper bygger främst på skillnader i *gag* och *env* (Charneau *et al.* 1994).

SIV_{cpz} potentiell ursprungsform till HIV-1

Varifrån kommer då HIV-1? Peeters *et al.* beskriver år 1989 hur de lyckats isolera ett lentivirus från en vild schimpans levandes i Gabon som genetiskt sett var mycket lik HIV-1. Dessa former av immunbristvirus som infekterar apor kallas med ett samlingsnamn SIV, simian immunodeficiency virus (Fig. 3). Schimpansen från Gabon var född i det vilda och hade aldrig utsatts för infekterat blod eller varit försöksdjur för HIV-forskning. Det var alltså det första fallet då man funnit ett SIV som liknade HIV-1 i ett naturligt tillstånd (Peeters *et al.* 1989). Viruset kallades för SIV_{cpz} (prefix står för chimpanzee). SIV_{cpz} är närmare besläktat med HIV-1 än med några andra aplika eller humana immunbristvirus.

Genom taxonomiska studier kan schimpansen delas in i två arter: Bonobo/Dvärgschimpans (*Pan paniscus*) och Schimpans (*Pan troglodytes*). Schimpansen delas in i 4 underarter (Bequet 2007, Bjork *et al.* 2010). Dessa 4 underarter är:

- Östschimpans (*Pan troglodytes schweinfurthii*)
- Centralschimpans (*Pan troglodytes troglodytes*)
- Västafrikans schimpans (*Pan troglodytes verus*)
- Nigeria-Kamerumschimpans (*Pan troglodytes ellioti*)

Hittills har man funnit fyra SIV_{cpz}-infekterade schimpanser (*Pan troglodytes*). En hane som försökte smugglas till Bryssel från Zaire kallad ANT1 (Peeters *et al.* 1992), två honor från Gabon kallade GAB1 och GAB2 (Peeters *et al.* 1989), och en hona fångad i Afrika och exporterad till USA där ursprungslandet var okänt (Gao *et al.* 1999). Denna individ hette Marilyn och hade aldrig använts i AIDS-forskning eller blivit utsatt för mänsklig smitta, men var 1985 den enda av 98 testade schimpanser som påvisade antikroppar som reagerade på HIV-1. Hon avled i samband med en dödfödsel av tvillingar 1985 (Gao *et al.* 1999). Man kunde visa att GAB1, GAB2 och Marilyn bar på virus som var närbesläktade med varandra och med alla andra typer av HIV-1. Dessa tre schimpanser var av samma underart, nämligen *Pan troglodytes troglodytes*. Den fjärde individen från Zaire, bar på ett mer divergent virus och klassificerades senare till underarten *Pan*

troglydytes schweinfurthii. Detta visar på en värdspecifik utveckling av viruset (Gao *et al.* 1999). Genom att jämföra de fylogenetiska positionerna av HIV-1-grupperna M, N och O med viruset såg man att undertyperna var starkt relaterade till det SIV_{cpz} som infekterar *P. t. troglodytes*. Man anser då att *P. t. troglodytes* är den naturliga värden till föregångaren för HIV-1 och att det därifrån härstammar (Gao *et al.* 1999). *P. t. troglodytes* utbredningsområden stämmer väl överens med de områden som drabbades av HIV-1 epidemin när den först bröt ut (Prince *et al.* 2002).

Studier har även gjorts på *P. t. verus* från Västafrika, både vilda och födda i fångenskap, och funnit att inga av de testade individerna har infekterats med SIV_{cpz}. Då schimpanser är extremt mottagliga för HIV-1 om de experimentellt introducerats för det, är det därför heller inte troligt att viruset existerar i *P. t. verus*. Man har tvivlat på att *P. t. troglodytes* var den naturliga värden för SIV_{cpz} då infektionen har varit extremt ovanlig bland fångslade och vilda schimpanser. Det ter sig nu inte så konstigt då de flesta fångslade schimpanser har sitt ursprung i Västafrika, alltså av underarten *P. t. verus* (Prince *et al.* 2002).

Detta styrker teorin om att *P. t. troglodytes* skulle vara källan till HIV-1 och att HIV-1 uppkom i Centralschimpansens levnadsområden, nämligen Centralafrika (Prince *et al.* 2002). Man har även kunnat visa på många olika subtyper av HIV-1 som cirkulerar i Centralafrika och även funnit många rekombinanter. Detta talar för teorin att Centralafrika är epicentret för HIV-1-pandemin (Vidal *et al.* 2000).

Uppkomsten av HIV-2

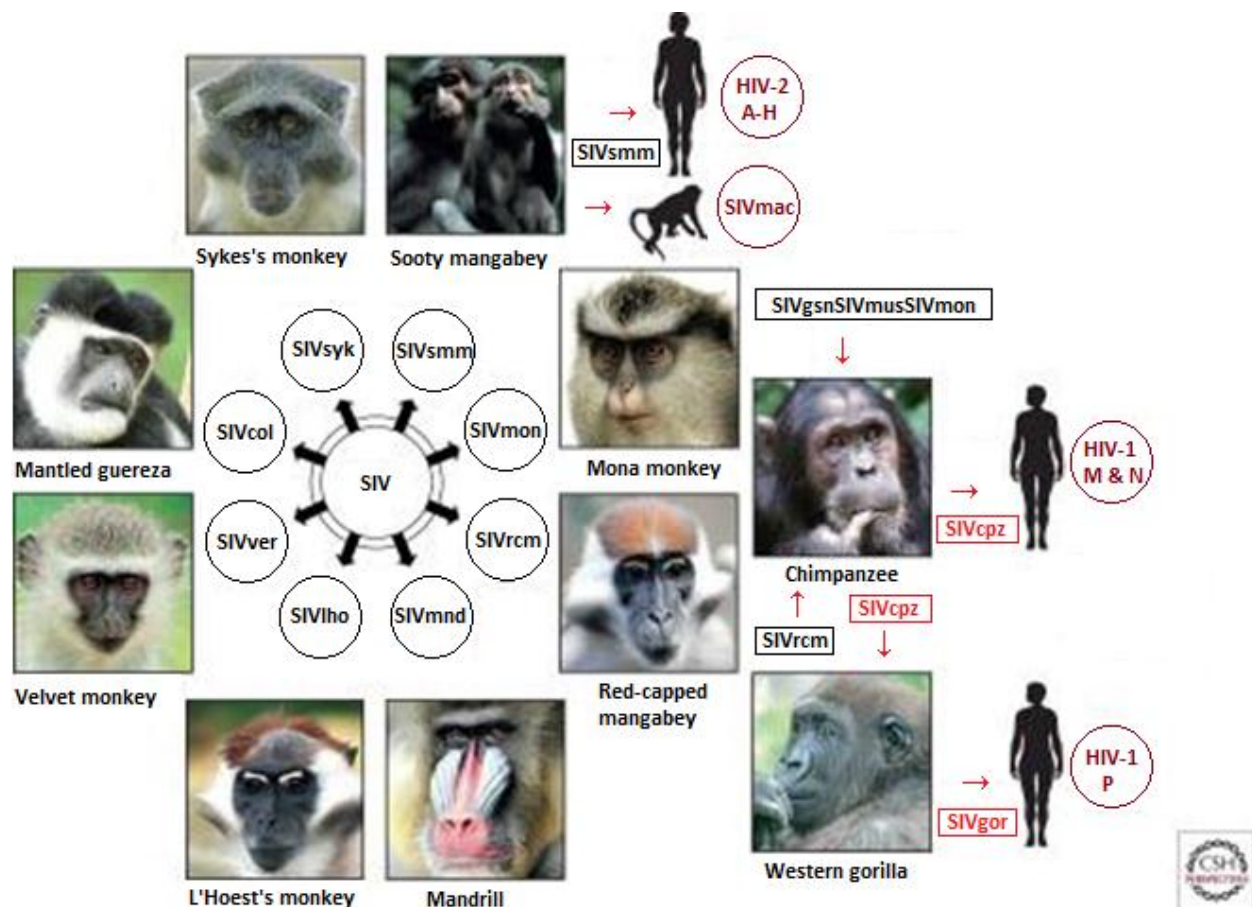
HIV-1 är den absolut vanligaste och aggressivaste formen av viruset idag. Det var även den formen som man först identifierade i början av 1980-talet. Några år senare upptäcktes fall av AIDS hos människor som inte påvisade några antikroppar mot HIV-1 (Clavel *et al.* 1986). Då man undersökte detta närmare, framförallt på två män från Västafrika, tillhörde de varken någon riskgrupp för HIV-1 eller kom ifrån områden där virusinfektion var särskilt utbredd. Man utförde tester på detta okända virus och såg att, precis som HIV-1, endast CD4⁺ T-lymfocyter infekterades av viruset (Clavel *et al.* 1986). Dessutom såg man genom elektronmikroskopi att typiska virioner knoppades av från de infekterade cellerna, precis som HIV-1. Det fanns dock olikheter, den mest påtagliga att inga antikroppar mot HIV-1 gick att påvisa. Man döpte därför detta virus till HIV-2 (Clavel *et al.* 1986).

HIV-2 har visat sig vara närbesläktat med ett virus som infekterat fångslade rhesusapor (*Macaca mulatta*) och gett dem AIDS-liknande symtom. 1987 gjorde Chakrabarti *et al.* en studie där de genom sekvensanalyser jämförde SIV_{mac} (prefixet står för apart, här står mac för *Macaca*) och HIV-1/HIV-2. Man fann då att SIV_{mac} och HIV-2 var homologa till 75% medan både SIV_{mac} och HIV-2 endast överensstämde ca 40% med HIV-1. De är därför relativt närbesläktade med varandra och båda avlägset besläktade med HIV-1.

Hur fick då rhesusapan SIV_{mac} och människan det närbesläktade HIV-2? Rhesusapan är inte en naturlig värd för SIV. Inga fall har studerats av vilda SIV-infekterade rhesusapor. De enda fallen av SIV-infekterade rhesusapor har varit i fångenskap och man tror då att smittan kan härröra ifrån en afrikansk primat, t ex. *Cercocebus atys* som är en naturlig värd för SIV. Man har kunnat spåra SIV_{mac} till början av 1970-talet från ett primatcenter i New England och man misstänker att rhesusaporna kan ha levt tillsammans med afrikanska primater, exempelvis *C. atys*, innan de

kom till centret och därifrån smittats med SIV (Hirsch *et al.* 1989). SIV_{sm} (sm står för sooty mangabey, det engelska namnet för *C. atys*) är starkt relaterat till SIV_{mac}, och därför förslagits vara föregångaren till SIV_{mac} (Hirsch *et al.* 1989). Det har även visats att SIV_{sm} är relaterat till HIV-2. Mest troligt är då att både SIV_{mac} och HIV-2 kommer ifrån SIV_{sm}. Flera observationer styrker denna teori, då individer infekterade med HIV-2 är vanligast i Västafrika där de delar samma geografiska område som *C. atys*. Dessa apor jagas där för mat och hålls som husdjur (Sharp *et al.* 1999). *C. atys* kan därför ha smittat människor i Västafrika med SIV_{sm} som sedan evoluerat till HIV-2 (Hirsch *et al.* 1989).

SIV_{mac} och SIV_{sm} är närmare besläktat till HIV-2 än vad SIV_{cpz} är till HIV-1 (Huet *et al.* 1990).



Figur 3. Det humana immunbristvirusets ursprung. SIV är samlingsnamnet för de immunbristvirus som infekterar apor där prefixstår för art. Man kan här se de olika vägarna viruset har tagit innan det infekterade människan. Denna bild är omritad efter Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, Vol 1, Sharp PM & Hahn BH, Origins of HIV and the AIDS pandemic, s 1-22, Copyright Cold Spring Harbor Laboratory Press (2011).

Naturlig immunitet

Veazey *et al.* gjorde 1998 ett experiment på rhesusapor (*Macaca mulatta*) där man visade att replikationen av SIV primärt skedde i mag- och tarmkanalen innan det gick att påvisa i lymfkörtlarna. De celler som infekterades av SIV och HIV var dessutom mycket mer förekommande i mag- och tarmkanalen än i periferin. De har visat sig vara CD4⁺ minnes-T-celler. Minnes-T-celler har blivit aktiverade genom kontakt med en patogen och känner på så vis snabbt igen den ifall de skulle stöta på samma mikroorganism en gång till, som om de hade ett minne (Abbas *et al.* 2012).

C. atys är en naturlig värd för SIV där infektionen inte tycks leda till AIDS. Vad är då skillnaden mellan dessa icke patogena immunbristvirus och de patogena som infekterar människan och rhesusapan? Man har kunnat visa att SIV-infekterade *C. atys* upplever en minskning av intestinala CD4⁺ celler som kan liknas vid den minskning som sker hos HIV-infekterade människor (Gordon *et al.* 2007). Hastigheten som dessa celler försvinner är dessutom liknande mellan SIV-infekterade *C. atys* och SIV-infekterade rhesusapor (en icke naturlig värd för viruset och som utvecklar AIDS) (Gordon *et al.* 2007). I en jämförande studie då man infekterade en grön markatta (*Chlorocebus sabaeus*) med SIV_{agm} (modell för naturligt icke-patogen infektion), en rhesusapa med SIV_{mac} (patogen infektion) och en rhesusapa med SIV_{agm} (kontroll) kunde man tydligt se att mängden intestinala CD4⁺ celler kraftigt minskade i alla tre fallen (Pandrea *et al.* 2007). Den typiska minskningen av de perifera CD4⁺ cellerna uteblev dock i de icke patogena infektionerna. Aktiveringen av immunförsvaret som man ser vid en patogen infektion verkade inte ske i samband med de icke-patogena infektionerna (Gordon *et al.* 2007).

Genom att jämföra 18 naturligt SIV-smittade och 13 icke infekterade *C. atys* kunde man visa att ingen signifikant skillnad finns mellan aktiveringen av deras immunförsvår. Den uteblivna immunreaktionen kan vara anledningen till varför återställandet av antalet CD4⁺ celler är betydligt mer effektivt i *C. atys* än i människor. Det är alltså inte minskningen av CD4⁺ cellerna eller hastigheten på sådan som avgör skillnaden mellan patogen eller icke patogen infektion, utan snarare graden av den lokala och totala immunreaktionen (Gordon *et al.* 2007).

Lokal immunreaktion

Hur klarar då dessa naturliga värdar infektionen utan att utveckla AIDS? En möjlig förklaring är att de lyckas bibehålla det mukosala skyddet även med låga mängder CD4⁺ celler. När immunförsvaret aktiveras vid en pågående infektion får det som följd att CD4⁺ celler börjar dela på sig och bli fler, för att med större kraft kunna skydda kroppen mot patogenerna. Ju fler CD4⁺ celler, desto fler celler att infektera. Viruset orsakar cytolys av många CD4⁺ celler men cytotoxiska CD8⁺ T-celler känner även igen infekterade celler och förstör dem. CD8⁺ T-cellerna bidrar således till minskningen av de mukosala CD4⁺ cellerna (Brenchley *et al.* 2004, Mattapallil *et al.* 2005). Immunbarriären mister till slut sin funktion och kroppens immunförsvår aktiveras kroniskt. Det är denna aktivering som verkar hållas tillbaka hos de naturliga värdarna för SIV, där infektionen inte är patogen. Att immunförsvaret inte aktiveras hos bland annat *C. atys* kan bero på att den låga halten av de kvarvarande CD4⁺ cellerna fortfarande bibehåller sin funktion att försvara slemhinnan, genom evolutionära anpassningar som tvingat de naturliga värdarna att klara av låga halter av CD4⁺ celler (Gordon *et al.* 2007).

Cytotoxiska T-celler

Rosenberg *et al.* beskriver 1997 hur de undersökt en patient som under 18 år levt som HIV-

positiv med mycket låga koncentrationer virus, oförändrade halter CD4⁺ celler och utan några sjukdomsrelaterade problem. Denna individ hade heller inte tagit någon förebyggande medicin. Patienten hade dock mycket starka immunreaktioner mot viruset i form av cytotoxiska CD8⁺ minnes-T-celler. Därför är även en stark aktivering av HIV-specifika CD8⁺ T-celler en möjlig förklaring till naturlig immunitet (Rosenberg *et al.* 1997).

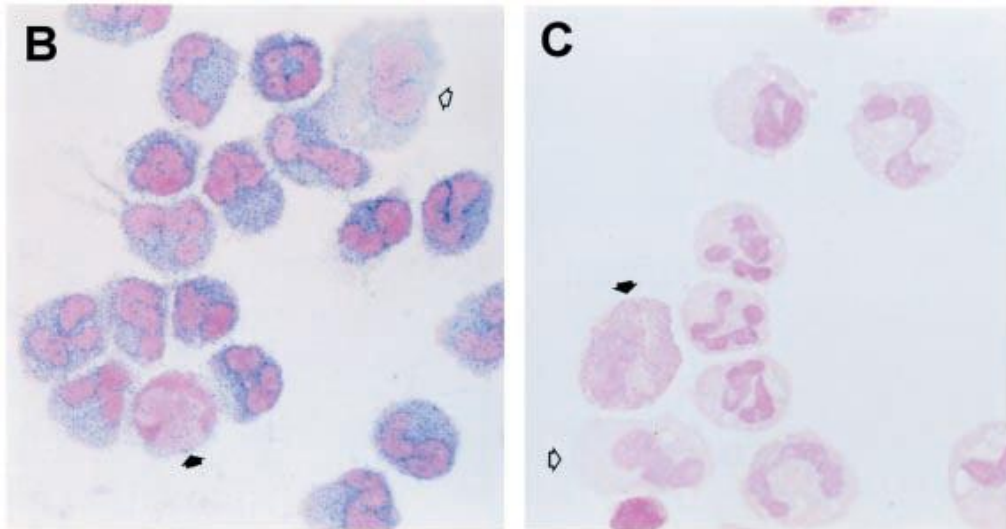
Defensiner

Defensiner är proteiner med antimikrobiell verkan och en del av det medfödda immunförsvaret. De produceras av celler i slemhinnan, så kallade epitelceller, och av vissa immunceller som innehåller ”korn”, kallade granulocyter. Neutrofiler är en typ av granulocyter som ”äter upp” mikrober och oskadliggör dem (Abbas *et al.* 2012). Defensiner finns hos både växter och djur. I vertebrater finns tre typer av defensiner; α -defensiner, β -defensiner och θ -defensiner (Tang *et al.* 1999). De har en katjonisk laddning, COOH-terminus och NH₂-terminus (α - och β -defensiner), och disulfidbindningar som binder ihop peptiden. Det är hur dessa bindningar sitter som skiljer α -defensiner och β -defensiner åt. θ -defensiner är däremot cirkulära, har varken C- eller N-terminus och de enda cirkulära defensiner man hittills funnit (Abbas *et al.* 2012).

θ -defensiner

θ -defensiner upptäcktes först 1999 av Tang *et al.* i rhesusapan och namngav det RTD-1 (rhesus theta defensin 1). De såg att denna typ av defensiner var naturligt cirkulära. I deras experiment utvann man defensiner ur vita blodkroppar. De flesta defensiner man fann var α -defensiner (7 av 8) men det θ -defensin man hittades hade större antibakteriell verkan än någon av de andra.

Man kunde visa genom infärgning av olika immunceller att RTD-1 finns i både neutrofiler och monocyter, båda två fagocytiska celler (Fig. 4). När man testade RTD-1 effekt mot gram-positiva bakterier, gram-negativa bakterier och svamp fann man att RTD-1 minskade deras livskraft med 99%, detta med en koncentration på 2-4 $\mu\text{g/mL}$ och inkuberat i 2 timmar. Ökade man koncentrationen så kunde man inte detektera några levande mikroorganismer alls (Tang *et al.* 1999).



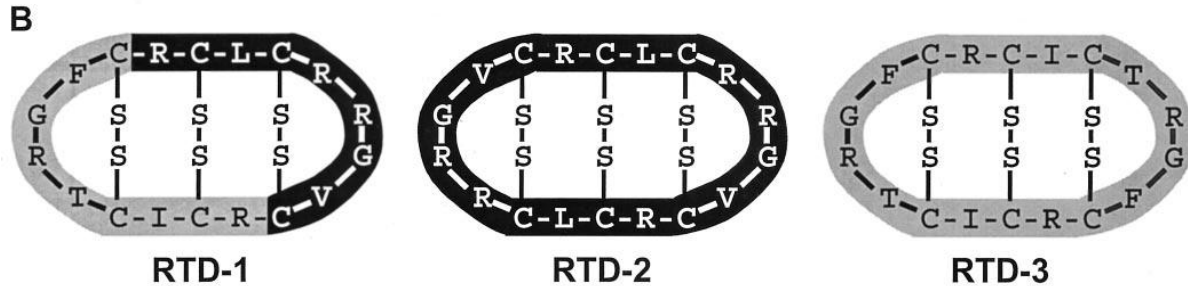
Figur 4. Infärgning av immunceller med antikroppar mot RTD-1. B) Visar att en stark infärgning sker av neutrofiler (blå). Monocyter färgas något svagare medan lymfocyter och eosinofiler inte färgas något alls (svart pil). I bild C) visas en kontroll där inga celler infärgats. Från Tang Y-Q, *et al.* 1999. A Cyclic Antimicrobial Peptide Produced in Primate Leukocytes by the Ligation of Two Truncated α -Defensins. *Science*. 286: 498-502. Omtryckt med tillstånd från AAAS.

Man tror även att den cirkulära formen på θ -defensin bidrar starkt till dess potenta verkan mot mikroorganismer, då man kunde visa skillnader på antimikrobiell effektivitet vid experiment med analoga peptider som var icke-cirkulära (Tang *et al.* 1999). De cirkulära θ -defensinerna är även oberoende av salthalt medan analoga linjära defensiner fungerar sämre och till och med slutar fungera vid salthalter runt 125 mM. De linjära analogerna har på grund av sina termini extra laddning och påverkas således mer av jonladdningar (Tang *et al.* 1999). Då de cirkulära defensinerna varken har N-terminus eller C-terminus påverkas de heller inte av exempelvis exopeptidas.

RTD-homologer

θ -defensiner består sammanlagt av 18 aminosyror som är sammanlänkade till en ring med tre cysteinbryggor. RTD-1 sammanställs av två nonapeptider som var och en kodas av en muterad α -defensingen. De ursprungliga peptiderna består av 12 aminosyror (Venkataraman *et al.* 2009). Peptiderna trimmas efter translation till de nonapeptider som sedan spliceras ihop till den slutliga produkten. De liknar den grekiska bokstaven Theta och har därefter fått sitt namn (Tang *et al.* 1999). 2001 visade Tran *et al.* att det fanns två cirkulära analoger till RTD-1. RDT-1 består av två heterodimeriska nonapeptider vid namn RTD-1a och RTD-1b. De förutsåg att det teoretiskt sett skulle kunna finnas analoger bestående av två RTD-1a peptider eller två RTD-1b peptider. Detta bevisades och de gavs namnen RTD-2 och RTD-3 (Fig. 5).

Dock är dessa homodimeriska analoger ganska ovanliga, det finns 10 gånger mer RTD-1 än RTD-2 och RTD-3 tillsammans. RTD-2 och RTD-3 är även de oberoende av salthalt för sin effektivitet gentemot mikroorganismer. Alla tre cirkulära defensiner uppvisar liknande förmåga att förgöra bakterier och svampar men har dock visats mindre effektiva mot svampar och kräver högre koncentrationer, än mot bakterier. RTD-2 kräver än lite högre koncentration än de två andra för att hålla samma kvalitet, ungefär dubbelt så mycket. Annars är de relativt likvärdiga (Tran *et al.* 2001).



Figur 5. De tre theta-defensiner som kartlagts. Heterodimeren RTD-1, homodimererna RTD-2 och RTD-3. Denna forskning publicerades ursprungligen i *Journal of Biological Chemistry*. Tran D, *et al.* Homodimeric θ -Defensins from *Rhesus macaque* Leukocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 277: 3079-3084. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Upptäckten av mänskliga pseudogener

Cole *et al.* beskriver 2001 hur de funnit mRNA i benmärg hos människan som är homologt med peptiderna som utgör θ -defensin i rhesusapor. I det mänskliga genomet finns totalt sex gener som kodar för θ -defensin. De kodande sekvenserna innehåller alla ett förtidigt stoppkodon och kallas därför istället pseudogener (Nguyen *et al.* 2003). Någon av dessa gener transkriberas dock och mRNA för θ -defensiner har hittats i benmärgen hos människor, och även på andra ställen så som i skelettmuskler och testiklarna. Alla sex pseudogener innehåller som sagt detta förtidiga stoppkodon och det gör även alla homologer av θ -defensingener som har hittats hos gorillor och schimpanser (Nguyen *et al.* 2003). I andra arter av Gamla Världens apor finns oskadade gener utan denna mutation som skapat det förtidiga stoppkodonet. Man har funnit θ -defensingener hos bland annat orangutangen. De mänskliga pseudogenerna och orangutangens θ -defensingener är till 90% identiska. Även fast orangutangen har oskadade θ -defensingener så har även där skett en mutation. Man jämför Gamla världens apor, orangutanger och människan, och ser att mutationen ligger på samma ställe hos de undersökta arterna nämligen på kodon 17. I de Gamla Världens apor som har oskadade θ -defensingener och fungerade θ -defensin kodar kodon 17 för ett histidin, CAC. Genom mutation har detta CAC blivit till ett GAC i Orangutungen och kodar istället för ett glutamin. I människan, gorillan och schimpansen har sedan GAC muterat till TAG, ett stoppkodon. Detta tyder på att stoppkodonen bildades i en gemensam förfader till människan, gorillan och schimpansen. Man har också dragit slutsatsen att mutationen som ledde till detta stoppkodon måste ha skett efter att människans förfader och orangutangen skiljdes åt i utvecklingen (Nguyen *et al.* 2003).

Retrocyklin

Cole *et al.* rekonstruerade 2001 denna pseudogen för att återskapa detta mänskliga θ -defensin, som döptes till "retrocyklin". Det mänskliga mRNA:t är mycket likt det hos rhesusapor och man tror därför att mutationen som ledde till ett stoppkodon skedde relativt nyligen i den mänskliga utvecklingen (Cole *et al.* 2001).

I det experiment som Cole *et al.* utförde 2001 testades retrocyklin för sin verkan mot HIV-1. Genom att inkubera CD4+ T-celler med olika stammar av viruset och med olika peptider kunde man visa på retrocyklins goda antivirala egenskaper. Retrocyklin visades ha god antiviral förmåga vid koncentrationer på 10-20 $\mu\text{g/mL}$. Det hindrar både M-tropiska och T-tropiska HIV-1-stammar från att infektera CD4+ celler *in vitro*, till och med bättre än den naturliga θ -

defensen RTD-1 (Cole *et al.* 2001). Retrocyklingen skyddar cellerna genom att binda till både CD4 och molekylen gp120 med hög affinitet. Dessa två molekyler är mycket viktiga för virusets anträngning av cellen. Wang *et al.* beskrev 2003 att om man kunde förhindra retrocyklingen att binda CD4 och gp120 ifall man glycosylerade dessa dvs. plockade bort eventuella sockermolekyler fästa på dem. Dessa fakta tyder på att retrocyklingen är och agerar som ett lektin. Owen *et al.* föreslog 2004 att ytterligare modifikation av syntetiskt retrocyklingen kunde vara till stor nytta och öka proteinets antimikrobiella egenskaper. De hade artificiellt ändrat på endast en aminosyra till en annan (arginin till lysin) och på så sett fått ett mycket starkare retrocyklingen

Har mänskliga celler ens förmågan att utföra de processer som krävs för att skapa funktionella θ -defensiner? Man har visat att så är fallet (Venkataraman *et al.* 2009). Dessa processer sker efter att peptiderna translaterats och mekaniken bakom är fortfarande okänd. De kunde producera aktiva retrocyklingen i mänskliga epitelceller och cervicovaginal vävnad genom att ta bort det förtidiga stoppkodonet i mänskliga pseudogener. Detta genomfördes av platsspecifik mutagenes då man muterar en utvald nukleotid. Mänskliga celler som transfekterats med muterade pseudogener kunde alltså generera funktionella retrocyklingen. Samma team gjorde även ett lyckat försök då de testade att genomläsa det förtidiga stoppkodonet (Venkataraman *et al.* 2009).

Frågor har rests kring immuna individer i Thailand som tillhör vissa riskgrupper för HIV-1. Har dessa människor återställda θ -defensiner och producerar dessa antimikrobiella peptider? Yang *et al.* visade i en rapport från 2005 att orsaken till deras immunitet högst troligtvis beror på något annat än fungerande θ -defensiner.

Det naturligt medfödda immunförsvaret

HIV-1 överförs främst genom slemhinnor. Den vaginala slemhinnan är en primär plats för infektion och är fullspäckad med dendritiska celler, T-lymfocyter och makrofager. Alla har receptorn CD4, som möjliggör för HIV-infektion. Denna slemhinna innehåller många av de peptider som kan skydda den mot infektion och här finns majoriteten av dessa antimikrobiella proteiner. Låga nivåer av dessa proteiner kan medföra en ökad risk att infekteras med HIV-1. Då slemhinnan blir infekterad ansamlas där en typ av immunceller vid namn neutrofiler. Neutrofiler innehåller granuler med hög halt α -defensiner, som frisläpps mot den invaderande patogenen. β -defensiner tillverkas alltid av epitelceller i slemhinnan (Cole *et al.* 2007).

Man kan se att en analog till retrocyklingen, RC-101, fungerar bra i den cervicovaginala vätskan där den är potent och ej bryts ned eller orsakar inflammation (Cole *et al.* 2006). När man nu ser att mänskliga epitelceller kan producera retrocyklingen, kan man med hjälp av tekniker som platsspecifik mutagenes sätta igång en produktion av retrocyklingen som kan utgöra en bra lokal medicin mot infektion av slemhinnan (Venkataraman *et al.* 2009).

Diskussion

HIV är en sexuellt överförbar sjukdom som främst smittas via slemhinnor. I slemhinnan hittas i stor utsträckning de celler som primärt infekteras av viruset (Veazley *et al.* 2000). Mycket fokus har legat på det förvärvade immunförsvaret som innefattar bland annat CD4⁺ T-celler, CD8⁺ T-celler och makrofager. Men vad har egentligen det medfödda immunförsvaret för roll? Finns där medfödda agenter som kan utgöra potentiella antimikrobicider? Defensiner är en grupp potenta

antimikrobiella peptider av det medfödda immunförsvaret, med potential att skydda mänskliga celler från HIV-infektion (Tang *et al.* 1999). Framförallt en typ av defensiner har visat sig vara extra potenta i skyddet mot HIV, nämligen θ -defensiner. θ -defensiner uttrycks inte funktionellt i människan men förekomsten av en pseudogen gör att forskare har kunnat framställa en kostgjord variant av ett mänskligt θ -defensin, kallat retrocyklin (Cole *et al.* 2001).

Retrocyklin uppvisar egenskaper som gör dem oerhört intressanta att vidare studera som potentiella läkemedel mot HIV/AIDS. De har visats mycket potenta i att blockera det humana immunbristvirusets antring i CD4⁺ celler (Cole *et al.* 2001). Då dess komplicerade och delvis okända tillverkningsprocess även är möjlig i epitelceller av mänskligt ursprung kan de möjligtvis kunna användas som endogena material. Då man kunnat återställa mutationen bakom det förtidiga stopkodonet, som avbryter translationen av proteinet, vore det möjligt att epitelcellerna i slemhinnan med denna nya mall själva kan uttrycka proteinet (Venkataraman *et al.* 2009). Och på så vis utnyttja kroppens egna förmågor samtidigt som man artificiellt hjälper den lite på traven. Hur detta kan göras krävs ytterligare forskning kring.

Retrocyklin kan modifieras till starkare antivirala agenter genom att byta ut aminosyror. Som Owen *et al.* antydde i sin rapport 2004 kan utvecklandet av retrocyklin fortfarande vara i sin linda och att mycket vinning kan tänkas finnas i att modellera proteinet till potentare former. Att retrocyklin saknar de laddade C- och N-termini som gör de motståndskraftiga mot peptidas, och att de accepteras i människokroppen även fast de i någon bemärkelse är ”främmande” talar också för de i sammanhanget intressanta utsikterna för denna mikrobicid.

Vissa menar att människans förmåga att smittas med HIV delvis kan ha att göra med att vi någonstans på vägen i vår utveckling förlorade kapaciteten att tillverka θ -defensiner (Cole *et al.* 2003). Detta anser jag vara mindre troligt. Det ironiska är att θ -defensiner finns hos rhesusapan men rhesusapan används som modell inom AIDS-forskningen då den utvecklar AIDS om smittad med SIV_{mac}. θ -defensin verkar alltså inte ha någon verkan i sin naturliga värld mot detta virus. Fler studier behövs på naturligt immuna individer, även från icke humana arter. Schimpansen som anses vara den naturliga värden för HIV-1 har även de icke-funktionella θ -defensin gener. Hur ser deras sjukdomsförlopp ut? Studier på schimpanser i det vilda är svåra att genomföra då schimpansen är en hotad art. Fler studier bör göras med retrocyklin *in vivo*.

Vare sig naturlig immunitet beror på det medfödda försvaret och θ -defensiner, det förvärvade försvaret med kraftiga eller lokaliserade immunreaktioner, eller på genetiska defekter som hindrar viral antring så anser jag att stort fokus bör ligga på naturlig immunitet i forskningen kring HIV/AIDS. Kanske kan vi med hjälp av naturens föränderlighet hitta nya bekämpningsmedel för komplicerade infektioner. Genom att ta hjälp av dessa metoder tror jag forskningen kan gå framåt och θ -defensiner verkar vara lovande potentiella mikrobicider att studera ytterligare.

Tack

Jag skulle vilja tacka min handledare Monika Schmitz och mina kurskamrater Henrik Hallgren, Matilda Björk, Kagendo Kubai och Kristoffer Forshufvud för betydelsefull återkoppling på mitt kandidatarbete.

Referenser

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, 2012. Congenital and acquired immunodeficiencies. I: Grulio R (red.). Cellular and molecular immunology, ss 458-468. Saunders, Philadelphia.
- Andreu K, *et al.* 2004. Contagious apoptosis facilitated by the HIV-1 envelope: fusion-induced cell-to-cell transmission of a lethal signal. *J Cell Sci* **117**: 5643-5653
- Barré-Sinoussi F, *et al.* 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871.
- Becquet C, *et al.* 2007. Genetic structure of chimpanzee populations. *PloS Genteics* **3**: 617-626.
- Berger EA, *et al.* 1998. A new classification of HIV-1. *Nature* **391**: 240.
- Bjork A, *et al.* 2011. Evolutionary History of Chimpanzees Inferred from Complete Mitochondrial Genomes. *Mol Biol Evol.* **28**: 615-623.
- Brenchley J.M. *et al.* 2004. T-cell subsets that harbour human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *Journal of Virology* **78**: 1160-1168.
- Brenchley J.M. *et al.* 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of Experimental Medicine* **200**: 749-759.
- Chakrabarti L, *et al.* 1987. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* **328**: 543-547.
- Charneau P. *et al.* 1994. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* **205**: 247-253.
- Chen Z. *et al.* 1997. Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry. *Journal of Virology* **71**: 2705-2714.
- Clavel F. *et al.* 1986. Isolation of a new human retrovirus from west african patients with AIDS. *Science* **233**: 343-346.
- Coakley E. *et al.* 2005. Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Current Opinion in Infectious Diseases* **18**: 9-15.
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. (red.) *Retroviruses*. Cold Spring Harbour (NY), Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1997.
- Cole AM, *et al.* 2001. Retrocyclin: A primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *PNAS* **99**: 1813-1818.
- Cole AM. 2003. Minidefensins and other antimicrobial peptides candidate anti-HIV microbicides. *Expert Opin. Ther. Targets* **7**: 329-341.
- Cole AM, *et al.* 2006. The retrocyclin analogue RC-101 prevents human immunodeficiency virus type 1 infection of a model human cervicovaginal tissue. *Immunology* **121**: 140-145.
- Cole AM, Cole AL. 2007. Antimicrobial polypeptides are key anti-hiv-1 effector molecules of cervicovaginal host defense. *American Journal of Reproductive Immunology* **59**: 27-34.
- Engelman A, Cherepanov P. 2012. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature reviews* **10**: 279-290.
- Gao F. *et al.* 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**: 436-441.
- Girard MP. *et al.* 2011. Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review. *Vaccine* **29**: 6191-6218.
- Gordon SN. *et al.* 2007 Severe depletion of mucosal CD4+ T cells in AIDS-free simian

- immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Immunol* **179**: 3026-3034.
- Gürtler LG, *et al.* 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *Journal of Virology* **68**: 1581-1585.
- Hirsch VM, *et al.* 1989. An African primate lentivirus (SIV_{sm}) closely related to HIV-2. *Nature* **339**: 389-392.
- Huet T. *et al.* 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**: 356-359.
- Katz RA, Skalka AM. 1994. The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 133-73.
- Landers ES, *et al.* 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- Levy JA, *et al.* 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiological Reviews* **57**: 183-289.
- Liu R, *et al.* 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**: 367-377.
- Mellors J.W. *et al.* 1997. Plasma viral load and CD4⁺ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* **126**: 946-954.
- NIAID. 2012. Structure of HIV. WWW-dokument 2012-04-03: <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/Pages/structure.aspx>. Hämtad: 2012-05-10.
- Nguyen TX, Cole AM, Lehrer RI. 2003. Evolution of primate α -defensins: a serpentine path to a sweet tooth. *Peptides* **24**: 1647-1654.
- Owen SM, *et al.* 2004. A theta-defensin composed exclusively of d-amino acids is active against hiv-1. *J. Peptide Res.* **63**: 469-476.
- Owen SM, *et al.* 2004. RC-101, a Retrocyclin-1 Analogue with Enhanced Activity against Primary HIV Type 1 Isolates. *Aids research and human retroviruses* **20**: 1157-1165.
- Pandrea I.V. *et al.* 2007. Acute loss of interstitial CD4⁺ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *Journal of Immunology* **179**: 3035-3046.
- Peeters M. *et al.* 1989. Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* **3**: 625-630.
- Peeters M. *et al.* 1997. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* **11**: 493-498.
- Peeters M, *et al.* 1992. Isolation and characterization of a new chimpanzee lentivirus (simian immunodeficiency virus isolate cpz-ant) from a wild-captured chimpanzee. *AIDS* **6**: 447-451.
- Prince AM. *et al.* 2002. Lack of evidence for HIV type 1-related SIV_{cpz} infection in captive and wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) in West Africa. *AIDS Research and Human Retroviruses* **18**: 657-660.
- Quinn TC. *et al.* 1997. Acute primary HIV infection. *JAMA* **278**: 58-62.
- Schacker T. *et al.* 1996. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med.* **125**: 257-264.
- Sharp PM. *et al.* 1999. Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol. Bull.* **196**: 338-342.
- Sharp PM, Hahn BH. 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**: 1.22.
- Swanson CM, Malim MH. 2008. Snapshot: HIV-1 Proteins. *Cell* **133**: 742-743.
- Tang T-Q, *et al.* 1999. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. *Science* **286**: 498-502.
- Tran D. *et al.* 2002. Homodimeric θ -defensins from *Rhesus macaque* leukocytes. *The Journal*

- of Biological Chemistry **277**: 3079-3084.
- UNAIDS. 2010. UNAIDS report on the global AIDS epidemic. WWW-dokument 2010-11-23: http://www.unaids.org/documents/20101123_GlobalReport_Chap2_em.pdf. Hämtad 2012-05-04.
- Vallari A, *et al.* 2011. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *Journal of Virology* **85**: 1403-1407.
- van der Kuyl AC. 2012. HIV infection and HERV expression: a review. *Retrovirology* **9**: 1-10.
- Veazey RS, *et al.* 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* **280**: 427-431.
- Veazey RS, *et al.* 2000. Dynamics of CCR5 expression by CD4+ T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology* **74**: 11001-11007.
- Venkataraman N, *et al.* 2009. Reawakening Retrocyclins: Ancestral Human Defensins Active Against HIV-1. *PloS* **7**: 720-729.
- Vidal N, *et al.* 2000. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *Journal of Virology* **74**: 10498-10507.
- von Sydow M, *et al.* 1988. Antigen detection in primary HIV infection. *British Medical Journal* **296**: 238-240.
- Wang W, *et al.* 2003. Retrocyclin, an Antiretroviral q-Defensin, Is a Lectin. *J Immunol* **170**: 4708-4716
- Yang C, *et al.* 2005. θ -Defensin pseudogenes in HIV-1-exposed, persistently seronegative female sex-workers from Thailand. *Infection, Genetics and Evolution* **5**: 11-15.