



Eventos moleculares en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana

Carlos Aponte¹.

¹Virólogo capontet@hotmail.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2) establece una infección persistente en su huésped, la cual conlleva al denominado síndrome de inmunodeficiencia humana adquirido (SIDA). La pandemia VIH/SIDA se inició en el año 1981. Desde ese momento, el VIH/SIDA no ha dejado de progresar y se estima que más de 30 millones de personas han sido infectadas desde entonces. Alrededor de nueve mil personas son infectadas cada día por el VIH, de los cuales el 90% pertenece al mundo en desarrollo. VIH pertenece a la familia Retroviridae (subfamilia: Lentivirinae), un grupo de virus isométricos envueltos de unos 90-140 nm de diámetro. Estos virus codifican para el enzima inversa-transcriptasa, la cual les permiten replicar su genoma, ARN, utilizando un intermediario ADN. En esta visión nos centraremos en tres eventos moleculares de importancia durante la infección por el VIH: (1) Enlace a la membrana de la célula huésped, (2) Genes regulatorios/accesorios de VIH-1 y (3) La inversa transcriptasa de VIH-1.

INTRODUCCIÓN

La música se hace a partir de sonidos. Los sonidos, en su orden, generan *el ritmo*, y es en el seno de éste que nace *la melodía*. Ahora bien, la construcción musical sólo es posible dado dos principios básicos: *la repetición recurrente y la variación*¹. Y es, basados en el principio de repetición recurrente, que Susumu Ohno y Midori Ohno² asignan un valor a las bases nitrogenadas del ADN [Adenina (A), Guanina (G), Timina (T) y Citosina(C)] dentro de la octava musical en orden de transformar una secuencia genética dada en notas musicales. Así, la vida demuestra ser una partitura en constante ejecución. Los retrovirus portan dentro de su cápside protéica su propia partitura genómica y es sólo cuando son transportados al núcleo e integrados a la del huésped que entonces una *disonancia* se produce. Esta disonancia por una infección por retrovirus se traduce en el huésped en: oncogénesis^{3,4}, inmunodeficiencia^{5,6} o neurodegeneración^{7,8}. Si bien es cierto que el mecanismo preciso por el cual el VIH causa el SIDA permanece sin ser elucidado, el VIH induce una dramática disminución de células T CD4⁺ que conlleva a una severa alteración del metabolismo celular⁹ e inmunodeficiencia^{10,11,12}. Durante la infección activa una sustancial cantidad de virus es presente en varios de los fluidos corporales con una importante utilización por parte del virus de diversos reservorios celulares (células T CD4⁺ de memoria y "naive") y sistémicos (p. ej. El sistema nervioso central)^{13,14}. En el plasma el recambio de partículas virales es alto con la producción de alrededor de 10⁹ partículas/día con una vida media del virión de aproximadamente de 6 horas^{15,16}. VIH es considerado que existe como una población de distintas variantes o "cuasiespecies", pues la alta frecuencia de mutación del virus (3 x 10⁵ mutaciones/nucleótido/ciclo de replicación) acoplada a la alta tasa continua de producción viral son la base sobre la cual descansa gran parte del reservorio de variantes dentro de un mismo hospedante y el blanco fértil para la acción de la presión de selección^{17,18}. Esta revisión enfoca enteramente tres etapas básicas en la multiplicación del VIH: (1) Enlace a la membrana de la célula huésped, (2) Genes regulatorios/accesorios de VIH-1 y (3) La reversa transcriptasa de VIH -1

LA PARTÍCULA VIRAL

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), es un bien conocido ejemplo de cómo una infección viral altera la homeóstasis celular y por ende la del huésped infectado. Los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2) y los virus de inmunodeficiencia simio (VISs) son los agentes etiológicos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en humanos y primates, respectivamente^{19,20,21,22}. HIV-1, HIV-2 y SIVs pertenecen a la familia *Retroviridae*, virus del tipo ARN que requieren un intermediario ADN para replicación. Los retrovirus son un grupo de virus isométricos envueltos de unos 90-140 nm de diámetro y que poseen dos tipos básicos de arquitectura viral que se encuentran tanto en partículas inmaduras como en partículas maduras. Al tipo 1 de arquitectura viral pertenece los tipos B, C, D y los spumaviridae, mientras que los lentivirus y el grupo viral de la leucemia bovina/virus de la leucemia de células T humana (VLB/VLTH) poseen una arquitectura del tipo 2²³. VIH posee cerca de 70 espículas/virión sobre su envoltura lipídica²⁶. Las espículas consisten de una molécula gp41 transmembranal que interactúa no-covalentemente con una molécula gp120 formando así una estructura oligomérica de carácter trimérico^{27,28}. La proteína de matrix (p17) delimita la membrana externa del virus de su core interno en una estructura de simetría icosaedrahédrica, y similarmente a otros lentivirus, la partícula madura de VIH contiene un core ribonucleoprotéico consistente en las proteínas p24

y p7/p6^{25,29}. Dos actividades enzimáticas se encierran en el core interno del virus, una actividad reversa transcriptasa/Rnasa H (RT) y una actividad integrasa (IN). El enzima reversa-transcriptasa permite replicar el genoma viral ARN utilizando un intermediario ADN y la actividad integrasa o endonucleasa, la cual cataliza la integración de la doble banda de ADN proviral del genoma viral en el interior del cromosoma huésped³². Los retrovirus contienen dos copias de un ARN de simple cadena/positiva de 7-10 kpb de longitud localizados en el core interno del virión. En las partículas maduras estas dos copias existen como un dímero unido no covalentemente ("kissing loop dimer")²⁴. Un esquema de una partícula viral madura se muestra en la Fig. 1.

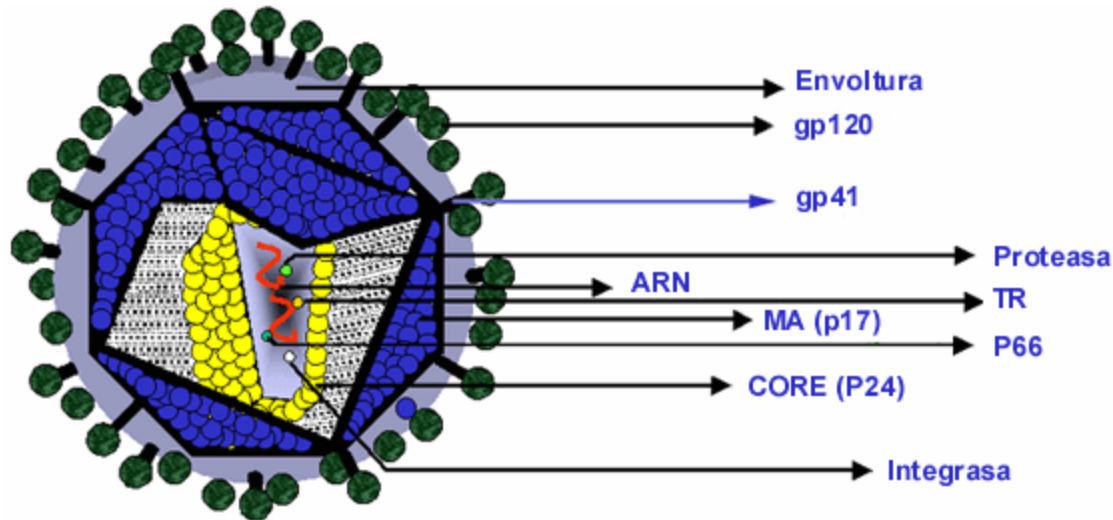


Fig.1. Organización de una partícula madura de VIH-1. La RNP es constituida por el core viral (nucleocápside), la integrasa, la proteasa y la transcriptasa reversa (TR). Una reorganización importante del interior del virión se produce gracias a un procesamiento proteolítico de la proteína MA. Una nueva disposición geométrica de la proteína Ma está asociada a la capacidad infecciosa. El dímero de ARN genómico se encuentra condensado en la NC. Las glicoproteínas de superficie (Gp120/gp41) se organizan sobre la envoltura viral.

VIH al igual que otros lentivirus de primates posee un genoma complejo de 9.7 Kb en la forma de provirus y los genes estructurales retrovirales *gag*, *pol*, y *env*, flanqueado en las extremidades 5' y 3' por los LTR ("long terminal repeats"). Una aspartyl proteasa, el cual realiza el procesamiento proteolítico de los productos poliprotéicos gag y gag-pol, es también codificada por el genoma viral³¹. En adición a éstos genes, el genoma de VIH contiene varios genes suplementarios no encontrados en la familia *Retroviridae* que codifican para proteínas denominadas auxiliares (Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu y Nef)^{5, 25}. La fig. 2 muestra una representación esquemática del genoma viral, su procesamiento y sus productos proteicos.

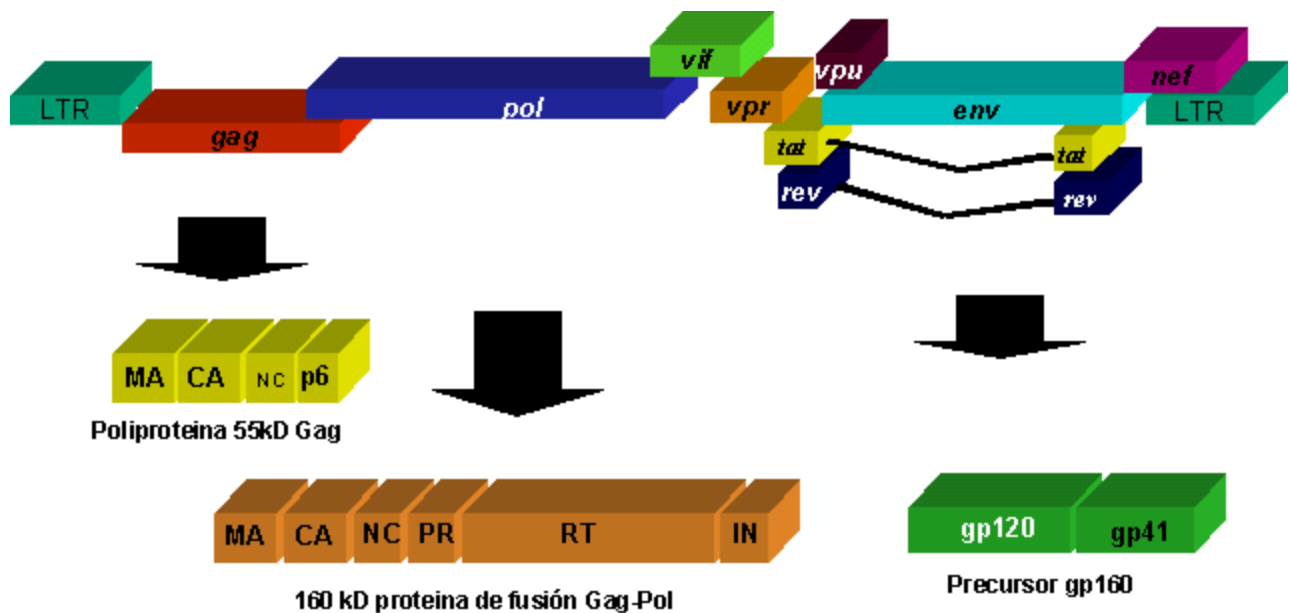


Fig. 2 Estructura genómica y procesamiento de las proteínas virales. La poliproteína meristilada de 55 kD Gag está compuesta de los dominios MA (matriz), CA (cápside), NC (nucleocápside) y p6 (con actividad facilitadora durante la liberación de la partícula y responsable de la incorporación de la proteína Vpr). Por acción de un corrimiento en el cuadro de lectura (frameshift) se produce una proteína de fusión (Gag-Pol) de unos 160 kD que provee de las actividades enzimáticas, tales reversa-transcriptas, RNasa H, proteasa. Las glicoproteínas de superficie (gp120 y gp41) son producidas a partir de un precursor poliprotéico de 160 kD y traducido a partir del gen env. El genoma de VIH codifica a su vez para varias proteínas accesorias denominadas Nef, Tat, Rev, Vif, Vpr y Vpu.

UNA RESEÑA SOBRE EL CICLO DE VIDA DEL VIH

La [Figura. 3](#) muestra los eventos claves del ciclo de vida del VIH. El virus inicia la infección por enlace de la partícula viral al dominio extracelular de la glicoproteína CD4 y a miembros de la familia de receptores de quimioquinas^{33, 34}. Este evento es seguido por la fusión de la membrana celular con la membrana viral en el cual la glicoproteína viral gp41 sufre rearrreglos conformacionales mayores facilitando la fusión misma en un mecanismo similar al de Influenza³⁵. Después de la liberación del core viral al interior de la célula, una actividad reversa transcriptasa es detectada, siendo cebada por moléculas de tRNA^{lys}³⁶. Dicha enzima cataliza la conversión del ARNs^b genómico viral en una estructura ADNdb. Un evento de integración prosigue al evento de retrotranscripción. Así, mediante la acción de una integrasa, codificada por el virus, el ADNdb proviral es insertado al azar en el interior del cromosoma hospedante. Una vez que el ADN proviral ha sido integrado al genoma huésped, el virus permanece en un estado latente. Dicho estado dependerá básicamente en tres mecanismos: (1) una restricción inicial al nivel de la transcripción proviral o iniciación, centrada en los LTR's, (2) factores regulatorios de transcripción celulares y (3) expresión de transcritos virales tempranos dependientes de elementos regulatorios virales, tales como *tat* y *Rev*^{37,38}. Los fenómenos de reactivación, replicación y deseminación requieren de la activación de la célula huésped a través de varios factores (antígenos, mitógenos, citoquinas, entre otras)³⁹. Los RNA's virales son entonces

sintetizados, procesados y transportados al citoplasma, donde son traducidos para producir las distintas proteínas virales. Así, las proteínas del core viral, los productos génicos *gag* y *pol*, ensamblan inicialmente dentro de nucleocápsides inmaduras, las cuales son procesadas por la proteasa viral durante gemación de la partícula infectiva.

TRES EVENTOS EN EL CICLO DE VIDA DEL VIH

1. Enlace a la membrana de la célula huésped.

El gen *env* de VIH codifica para un único producto glicoprotéico, gp160, el cual es clivado para producir dos productos, gp120 y gp41²⁶. El virus enlaza a la superficie celular a través de una interacción de alta afinidad (1-10 nm) entre gp120 y el receptor celular, CD4^{40, 41}, y un co-receptor, miembro de las familias de los receptores transmembranales de quimoquinas^{42,43} con afinidades 80-1000 nm³⁴. Una buena parte de la actividad neutralizante en el suero proveniente de pacientes VIH+ es dirigido contra las proteínas gp120 y gp41²⁶. gp120 es una proteína glicosilada, cuyos carbohidratos constitutivos contribuyen significativamente al enlace con la molécula CD4. Por su parte, CD4 se distribuye en diversas poblaciones celulares, tales como células T, macrófagos, células dendríticas y microglía⁴³ y parece ser el principal elemento receptor para VIH. Sin embargo, para VIH se han reportado ¿como se indicó- al menos dos co-receptores de quimoquinas, CXCR4 y CCR5^{42, 43}, implicados en la entrada del virus. CD4 enlaza dentro de un bolsillo en la glicoproteína gp120 cuya área de contacto es de una extensión de ~ 800 angstroms³³. Una región adyacente a la sección "V3 loop", área altamente variable en la glicoproteína gp120 y que tiene un rol en la determinación del tropismo y en la inducción de anticuerpos neutralizantes^{44,45}, parece contactar con el receptor CCR5 localizado sobre la membrana celular³³. Polimorfismo para la molécula CCR5 implicado en resistencia a la infección por el VIH ha sido reportado⁴⁶. Así, la variante por delección, D 32, es presente alrededor de un 5% de los individuos resistentes⁴⁷. Por su parte, la molécula CXCR4 (llamado "fusina"), primer co-receptor detectado para VIH⁴⁸, es un receptor celular para el factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1). Diversos trabajos parecen indicar el rol de CXCR4 en infección por el VIH. Así, una línea celular macacariocítica UT-7 CD4+ resistente a la infección deviene susceptible después de transfección con el gen codante para CXCR4⁴⁹ y células neuronales CD4- son susceptibles a la infección por el VIH por utilización de este receptor celular⁵⁰.

Si bien la presencia de otros co-receptores potenciales ha sido reportada para VIH, su existencia es aún controversial. Sin embargo, proteoglicanos heparan-sulfato (HSPG), receptores manosa, receptores de adhesión de leucocitos, CD26, CD44, CD7 y galactosilceramida, han sido implicados como medios de entrada para VIH³⁴.

2. Genes regulatorios/accesorios de VIH-1

Como se destacó anteriormente, el genoma de VIH contiene los genes estructurales (*gag* y *env*) y enzimático (*pol*) cuya definición y organización es típica de la familia *Retroviridae*. Sin embargo, además de éstos genes característicos, el genoma de VIH codifica para proteínas regulatorias de

la expresión viral (Tat y Rev) como también proteínas "auxiliares" (Nef, Vif, Vpu y Vpr) con funciones modulatorias de la expresión viral y de la patogénesis.

(2.1) *tat*.

Es el denominado gen transactivador. Dicho gen es un regulador positivo que incrementa la tasa de su propia síntesis y la síntesis de todas las otras proteínas virales⁵. La proteína Tat tiene un peso molecular de unos 16 Kda y toda su función transactivadora es localizada en la región N-terminal de unos 72 amino ácidos, codificada por el primer exón⁵¹. La función de Tat es dependiente de una secuencia específica de reconocimiento, Tar, localizada en la región 5' de los ARN mensajeros virales (ARNm) en posición +1 y +45. Tat actúa básicamente en la etapa de elongación transcripcional utilizando varios cofactores celulares para su acción⁵². Así, un complejo proteína quinasa celular llamado TAK (Tat-associated kinase) es capaz de fosforilar el extremo COOH-terminal (CTD) de la ARN polimerasa II, pues una hiperfosforilación de esta fracción estimula una eficiente elongación transcripcional. El componente quinasa del complejo TAK, Cdk9, interacciona con la proteína Ciclina T (CycT) celular, la cual incrementa la afinidad de la proteína Tat por Tar³⁰.

(2.2) *rev*.

El regulador de la expresión proteica viral, la proteína Rev (~ 18 kD), consiste de un dominio NH₂-terminal que (1) media enlace con una larga estructura ARN "stem-and-loop" de 234nt y localizada en el intron *env* (llamada RRE ?Rev-responsive element-)⁵⁴, (2) permite multimerización Rev-Rev sobre un único ARN viral portando secuencias RRE⁵⁵ y (3) posee secuencias que determinan retención nuclear⁵⁶. La región COOH-terminal con una secuencia consensus para una señal de exportación nuclear (NES)⁵⁷. Así, la proteína Rev facilita la exportación de ARNm virales, unspliced (~ 9 kb) y parcialmente spliced (~ 4 kb), del núcleo al citoplasma celular en cooperación con factores celulares, Exportina-1(XPO) y Ran guanosina trifosfato³⁰.

(2.3) *vpu*.

Vpu, la proteína accesoria transmembranal de unos 16 kD, fue implicada en el eficiente ensamblaje y gemación de las partículas virales⁵¹. Experimentos utilizando NMR (Resonancia Magnética Nuclear) demuestran que la proteína Vpu forma discretos canales iónicos en bicapas lipídicas, cuya actividad está asociada al dominio helicoidal transmembranal de la proteína⁵⁸. Vpu interactúa a nivel del retículo endoplásmico (RE) con la molécula CD4 activando un mecanismo de proteólisis mediado por un sistema proteosoma-ubiquitina³⁰. Sin embargo, experimentos de co-inmunoprecipitación demuestran que CD4 y Vpu también interactúan en la superficie celular⁵⁹, sugiriendo una posible inhibición de la actividad de Vpu por disrupción de su estructura oligomérica.

(2.4) Gen *nef*.

Similarmente a *Tat* y *Rev*, el gen *nef* es expresado tempranamente durante replicación viral. *Nef* es una secuencia altamente polimórfica. *Nef* parece ser un factor regulatorio negativo en la

expresión genética viral; así, mutantes *nef*⁻ defectivos parecen replicar más eficientemente que aquellas partículas *nef*⁺ ⁶⁰. Sin embargo, datos contradictorios han sido publicados⁶¹.

La proteína Nef es de unos 27 kD y contiene ácido mirístico al extremo NH₂-terminal⁶². Nef interactúa con la molécula CD4 en la membrana plasmática promoviendo el enlace con el adaptador AP-2 y el consecuente reclutamiento en clatrina-coated pits, siendo CD4, por tanto, procesada por endocitosis⁶³. Así, un mecanismo de "down regulation" se establece alterando el tráfico de la molécula CD4, el cual parece ser un mecanismo utilizado por el virus para así establecer un óptimo de producción viral³⁰. Este eficiente mecanismo de regulación de la expresión del receptor CD4⁺ parece necesitar de la actividad de tres proteínas virales: Env, Nef y Vpu.

(2.4) *vif*.

La proteína Vif (factor de infectividad viral) (23 kDa) parece estar implicado en la eficiencia de transmisión de la infección por el VIH-1. Así, partículas *vif*⁻ negativas son ineficientes en infección⁶⁴. Recientes hallazgos⁶⁸ parecen indicar que partículas defectivas en *vif* son ineficientes en elongación del ADN viral. La proteína Vif es fosforilada y regulada por la proteína quinasa MAPK⁶⁵, quinasa activada por mitógenos. Vif posee un dominio básico, 90RKKR93, el cual parece estar implicado -también- en la regulación del tráfico nucleocitoplasmático⁶⁶. Por otro lado, la proteína ha sido implicada en el ensamblaje e infectividad de la progenie viral. Así, la poliproteína p55 (Gag) y Vif copurifican en complejos citoplasmáticos libre de membranas⁶⁷, lo que parece confirmar el aspecto de intermediario de ensamblaje de la proteína Vif.

3. La reversa transcriptasa de VIH ?1

Una actividad de transcripción del tipo ADN dependiente de ARN [transcriptasa inversa o retrotranscriptasa (RT)] toma lugar en el citoplasma de la célula infectada después de la penetración y decapsidación parcial de la partícula viral⁶⁸. Actividad retrotranscriptasa ha sido detectada en sistemas diferentes a los retrovirus. Así tenemos que mitocondrias proveniente de la planta *Oenothera*, los virus de hepatitis B, cauliflower mosaic virus y varias cepas bacterianas poseen genomas que sintetizan para enzimas con actividad retrotranscriptasa^{3, 69, 70}.

La retrotranscriptasa, VIH-1 RT, esta compuesta de dos subunidades de 66 kDa y 51 kDa denominados p66 y p51, respectivamente⁷¹. La porción N-terminal de la subunidad p66 (de unos 440 aminoácidos) constituye el dominio polimerasa, y la porción C-terminal (de unos 120 aminoácidos) comprende el dominio RNasa H. Dicho dominio C-terminal envuelve la digestión de la fracción ARN de la duplex heteropolimérica ARN:ADN generada por retrotranscripción en fragmentos oligoméricos de unos 7 ? 13 nucleótidos de longitud⁷². Asimismo, la subunidad p51 corresponde al dominio polimerasa de la subunidad p66, pues la misma es generada por clivaje proteolítico. Las dos subunidades tienen en común cuatro subdominios, los cuales son denominados "fingers", "palm", "thumb" y "connection" ⁷³. El subdominio "palm" contiene residuos de importancia en la actividad catalítica y su estructura plegada recuerda el plegamiento de los dominios catalíticos de otras ARN y ADN polimerasas⁷⁴. La actividad

retrotranscriptasa realizada sobre el ARN viral es cebada por una molécula de ARN de transferencia, tARN^{Lys} y el ion preferencial es Mg²⁺ a unos 10 mM ²⁴.

Tres estudios recientes sobre la estructura cristalina de HIV-1 RT han aportado nuevas perspectivas en los mecanismos moleculares que confieren la resistencia a ciertas drogas antiretrovirales. Así, Jacobo-Molina et al. (1993)⁷⁵ estudió por difracción de Rayos X un complejo ternario de HIV-1 RT (Heterodímero p66/p51), un ADN patrón doble cadena de 19-bases/18-bases:primer y un fragmento Fab de un anticuerpo monoclonal a una resolución de 3.0 angstroms. Kohlstaedt, L. et al. (1992)⁷³ describieron la estructura cristalográfica de HIV-1 RT acomplexada con el inhibidor "Nevirapine" a una resolución de 3.5 angstroms. Por último, Huang et al. (1998)⁷⁶ determinaron la estructura de un cristal de HIV-1 RT enlazada por crosslinking con un ADN patrón: primer y un deoxynucleotide trifosfato (dNTP) a una resolución de 3.2 angstroms.

Numerosos protocolos de tratamiento para el SIDA incluyen análogos de nucleósidos bloqueadores de la elongación de la cadena ADN viral [3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT), 2',3'-dideoxyinosine (ddI), y 2'-deoxy-3'-thiacytidine (3TC)] y a inhibidores de la RT no nucleosidos [derivados del tetrahydrobenzodiazepine (TIBO) y la dipyrindodiazepinone, Nevirapine, Delavirdine] Tanto estudios teóricos como empíricos durante la infección de VIH demuestran la alta tasa de recambio viral y la subsecuente emergencia de resistencia viral⁷⁷. Bien es cierto que el alto grado de variación en los diferentes aislados de VIH esta en relación directa a la alta tasa de incorporaciones erradas de nucleótidos de la RT dado la ausencia de un mecanismo 3' 5' -exonucleasa de lectura y corrección ("Proofreading") propio de las ADN polimerasas¹⁸. La aparición de mutantes del virus resistentes a drogas puede emerger bajo la presión selectiva generada por una terapia prolongada o un cambio de la misma. Así, ciertas mutaciones puntuales en la estructura de HIV-1 RT parecen ser suficientes para inducir resistencia: Lys65Arg, Lys70Arg, Leu74 Val, Gln151Met, Met184Ile/Val y Thr215Tyr/Phe^{77, 78}.

CONCLUSIÓN

Los eventos moleculares que definen la exquisitez con la cual el VIH toma posesión de la maquinaria celular nos sigue sumiendo en la admiración y la perplejidad. Hoy por hoy tenemos conocimientos bastante precisos sobre la interacción temprana virus:célula, penetración, decapsidación, retrotranscripción, integración, activación, ensamblaje y gemación de la partícula viral infecciosa. Si bien hemos centrado la atención básicamente en tres de estos eventos claves en la infección por el VIH, el conocimiento integral de todos y cada uno de los mismos es prioritario para especificar una terapia efectiva y/o el establecimiento de una vacuna eficaz.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salvat S.A. (1984) La "Novena" como ejemplo. En la Enc. Salvat Gr. T. Mús. Salvat S.A. de Ediciones, pp. 9-17
2. Ohno, S & Ohno, M (1986) The all pervasive principle of repetitious recurrence governs not only coding sequence construction but also human endeavor in musical composition. Immunog. 24: 71- 78

3. Cann, A. J. (1997) Cell transformation by retroviruses. In Principle of Molecular Virology. Academic Press. pp 216-221
4. Löwer, R. (1999). The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. TIM. 7: 350-356
5. Clements, J. & Payne, S. (1994) Molecular basis of the pathobiology of lentivirus. Virus Res. 32: 97-107
6. Levy, J. (1993) Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection Microbiol. Rev. 57:183-289
7. Price, R. (1996) Neurological complications of HIV infection. The Lancet. 348: 445-452
8. Fujinami, R. & Libbey, J. (1999) Endogenous retroviruses: are they the cause of multiple sclerosis. TIM. 7: 263-264
9. De Simone, C, Famularo, G., Cifone, G. & Mitsuya, H. (1996). HIV infection and cellular metabolism. Imm.Today
10. Oleske, J., Minnefor, A., Cooper, R., Thomas, K., dela Cruz A., Ahdieh, H., Guerrero, I., Joshi, V., and Desposito, F. (1983) Immune deficiency syndrome in children JAMA. 249: 2345-2349
11. Schittman, S. & Fauci, A. (1994). Human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome: an update. Ad. Int. Med. 39:305-355
12. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C. & Rey, F. et al (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency virus. Science. 220: 868-871
13. Graziosi, C., Pantaleo, G., Demarest, J.F. et al. (1993). HIV-1 infection in the lymphoid organs. AIDS (suppl 2): S53-S58
14. Cavert, W. & Haase, A. T. (1998). A national tissue bank to track HIV eradication and immune reconstitution. Science 280: 1865-1866
15. Ho, D.D., Neumann, A.U. & Perelson, A.S. et al. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4+ lymphocytes in HIV-1 infection. Nature. 373: 123-126
16. Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.N. et al. (1995) Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature 373: 117-122
17. Coffin, J.M. (1996) HIV viral dynamics. AIDS 10 (suppl 3): S75-S84
18. Domingo, E. & Holland, J.J. (1997) RNA virus mutations and fitness for survival. Ann. Rev. Microbiol. 51: 151-179
19. Birx, D.L., VanCott, Th., Michael, N. et al. (1996) Summary of track A: Basic science. AIDS 10 (suppl 3): S85-S106
20. Dyer, J.R., Kazembe, P., Vernazza, P.L. et al. (1998) High levels of human immunodeficiency virus type 1 in blood and semen seropositive men in sub-saharan Africa. J. Inf. Dis. 177: 1742-1746
21. Stahl-Hennig, Ch., Steinman, R.M., Tenner-Racz, K. et al. (1999) Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus. Science 285: 1261-1265
22. Schlinger, K., Mancini, M., Tiollais, P. & Michel, M-L. (1995) Vaccination contre le SIDA: évaluation chez les primates. Med/Sci 11: 985-993
23. Nermut, M., Hockley, D. (1996). Comparative morphology and structural classification of retroviruses. In Morphogenesis and maturation of retroviruses. Editado por Kraüsslich H-G. Curr. Top. Microb. Imm. Springer Verlag. 214: 1-24
24. Coffin, JM. (1996) Fields Virology. ed. BN Fields, DM. Knipe, PM Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven. 3: 1767
25. Frankel, AD. & Young, JA. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. Ann Rev. Bioch. 67: 1-25

26. Gelderblom, H.R. (1991) Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS*. 5: 617-638
27. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*. 22: 426-30.
28. Sattentau, QJ., Zolla-Pazner, S. & Poignard, P. (1995) Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Cell*. 89: 263-
29. Wilk, T. & Fuller, S. (1999). Towards the structure of the human immunodeficiency virus: divide and conquer? *Curr. Op. St. Biol*. 9: 231-243
30. Emerman, M & Malin, M. (1998). HIV-1 regulatory/accessory genes: Keys to unraveling viral and host cell biology. *Science*. 280:1880-1884
31. Hodge, CN., Straatsma, TP., McCammon & Wlodawer, A. (1997) Rational design of HIV protease inhibitors. *Structural Biology of Viruses*. ed. Chiu, W. Burnett, R. & Garcea, R. Oxford University press, Inc. 17: 451-473
32. Steffy, K & Wong-Staal, F. (1991) Genetic regulation of human immunodeficiency virus. *Microb. Rev*. 55: 193-205
33. Wyatt, R. & Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens and immunogens. *Science*. 280: 1884-1888
34. Ugolini, S., Mondor, I. & Sattentau, QJ. (1999). HIV-1 attachment: another look. *TIM*. 7: 144-149
35. Bullough, PA., Hughson, FM., Skehel, JJ. & Wiley, DC. (1994) Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion [see comments] *Nature*. 371: 37-43
36. Jacobo-Molina, A. & Clark, AD.Jr., Nanni, RG., Arnold, GF., et al. (1990) Biochemical and crystallography studies of HIV reverse transcriptase. *UCLA symposium, Keystone, Colorado: HIV and AIDS: Pathogenesis, therapy, and vaccine*. J. Cell. Biochemistry. S14D, Abst. No. L127
37. Laughlin, MA. & Pomerantz, RJ. (1994) Cellular latency in HIV infection. *Clin. Lab. Med*. 14: 239-255
38. Shaw, JP., Ultz, PJ., Durand, DB., Toole, JJ. et al. (1988) Identification of a putative regulator of early T cell-activation genes. *Science*. 241: 202-205
39. Laurence, J. (1996) CD4+ and CD8+ T lymphocyte activation in HIV infection. Implication for immune pathogenesis and therapy. In *Cell Activation and Apoptosis in HIV infection*. : 1-15
40. McDougal, JS., Kennedy, MS., Slish, JM. et al. (1986). Binding of the human retrovirus HTLV III/LAV to T4+ T cell by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science*. 231:382-385
41. Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, JM. et al. (1996) CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR5 *Nature*. 384: 184-187
42. Rizzuto, CD., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, PD. et al. (1998) *Science*. 280: 1949-1953
43. Kwong, PD. Wyatt R., Robinson J., Sweet RW., et al. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 393: 648-659
44. McKeating, JA., McKnight, A. & Moore, JP. (1991) Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity. *J. Virol*. 65: 852-860
45. Poignard, P. Klasse, PJ. & Sattentau, QJ. (1996) Antibody neutralization of HIV-1. *Imm. Today*. 17:239-46

46. Samson, M., Libert, F., Doranz, BJ. et al. (1996) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 382: 722-725
47. Iglesias, E. (1998). Correceptores del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. *Biotechn. Aplic.* 4: 219-226
48. 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
49. Baiocchi, M., Olivetta, E., Chelucci, C. et al. (1997) Human immunodeficiency virus (HIV) ? resistant CD4⁺ UT-7 megakariocytic human cell line become highly HIV-1 and HIV-2 susceptible upon CXCR4 transfection: induction of cell differentiation by HIV-1 infection. *Blood*. 89: 2670-2678
50. Hasselgesser, J., Halks-Miller, M., Del Vecchio, V. et al. (1997) CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr. Biol*. 7: 112-121
51. Haseltine, WA. (1990) Molecular biology of HIV-1. *AIDS and the new viruses*. Ed. AG. Dalgleish & RA. Weiss. Academic Press limited. 2: 11-40
52. Sodroski, J., Rosen, C., Wong-Staal, F., Salahuddin, S.Z. et al. (1985) Trans- acting transcriptional regulation of human T-cell leukemia virus type III long terminal repeat. *Science*. 227: 171-173
53. Jones, K. & Peterlin, B. (1994) Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Ann. Rev. Bioch.* 63: 717-743
54. Battiste, JL., Mao, H, Rao, NS. et al. (1996) a helix- RNA major groove recognition in an HIV-1 Rev peptide- RRE RNA complex *Science*. 273: 1547-1541
55. Madore, SJ., Tiley, LS., Malim, MH. & Cullen, BR. (1994) Sequence requirement for Rev multimerization in vivo. *Virology* 202: 186-194
56. Böhnlein, E., Berger, J. & Hauber, J. (1991). Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex. *J. Virol*. 65: 7051-7055
57. Meyer, BE., Meinkoth, JL. & Malim, MH (1996) Nuclear transport of the human immunodeficiency virus type 1, Visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J. Virol*. 70: 2350-2359
58. Marassi FM; Ma C; Gratkowski H; Straus SK; Strebel K et al. (1999) Correlation of the structural and functional domains in the membrane protein Vpu from HIV-1 *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14336-14341
59. Bour S; Perrin C; Strebel K (1999) Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *J Biol Chem* 274: 33800-33806
60. Subbramanian, RA. & Cohen, EA. (1994) Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J. Virol*. 68: 6831-6835
61. Hammes, SR., Dixon, EP., Malin, MH., Cullen, BR. & Green, WC. (1989) Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *PNAS. USA*. 86: 9549-9553
62. Muesing, MA., Smith, DH., Cabradilla, CD., Benton, CV. et al. (1985) Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* 313: 450-458

63. Greenberg, ME. et al (1997) Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J.* **16**: 6964-6976
64. Fisher, AG., Ensoli, B., Ivanoff, L., Chamberlain, M. et al. (1987) The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* **237**: 888-893
65. Yang X & Gabuzda D. (1998) Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein. *J Biol. Chem.* **273**:29879-29887
66. Friedler A; Zakai N; Karni O; Friedler D; Gilon C; Loyter A. (1999) Identification of a nuclear transport inhibitory signal (NTIS) in the basic domain of HIV-1 Vif protein. *J Mol Biol* **289**:431-437
67. Simon JH; Carpenter EA; Fouchier RA; Malim MH Vif and the p55(Gag) polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 are present in colocalizing membrane-free cytoplasmic complexes. (1999) *J Virol* **73**:2667-2674
68. Mitsuya, H., Yarchoan, R., Broder, S. (1990) Molecular targets for AIDS therapy. *Science* **249**: 1533-1544
69. Schuster, W. & Brennicke, A. (1987) Plastid, nuclear and reverse transcriptase sequence in the mitochondrial genome of *Oenothera*: is genetic information transferred between organelles via RNA? *EMBO J.* **6**: 2857-2863
70. Inouye, S., Hsu, MY., Eagle, S. & Inouye, M. (1989) Reverse transcriptase associated with the biosynthesis of the branched RNA-linked msDNA in *Myxococcus xanthus*. *Cell.* **56**: 709-717
71. Jacobo-Molina, A. & Arnold, E. (1991) HIV reverse transcriptase structure-function relationships. *Biochemistry* **30**: 6351-6
72. Goff, SP. (1990) Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function. *J. Acq. Imm. Def. Syndr.* **3**: 817-831
73. Kohlstaedt, LA., Wang, J., Friedman, JM., Rice, PA., Steitz, TA. (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science.* **256**: 1783-1790
74. Johnson, MS., McClure, MA., Feng, DF., Gray, J., Doolittle, RF. (1986) Computer analysis of retroviral pol genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *PNAS. USA.* **83**: 7648-7652
75. Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, RG., Clark, AD., Xiaode, L. et al. (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *PNAS USA.* **90**: 6320-6324
76. Huang, H., Chopra, R., Verdine, GL., Harrinson, SC. (1998) Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science.* **282**: 1669-1675
77. McCutchan, FE., Salminen, MO., Carr, JK., Burke, DS. (1996) HIV-1 genetic diversity *AIDS* **10**: S13-S20
78. Richman, DD. (1993) HIV drug resistance. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **32**: 149-164