



NEF: EL FACTOR VIRAL A BATIR EN LA LUCHA CONTRA EL VIH

Joel Morales González
Tutorizado por Agustín Valenzuela-Fernández

**Máster Universitario en Investigación y
Diagnóstico de Enfermedades Tropicales**



**Escuela de Doctorado
y Estudios de Posgrado**
Universidad de La Laguna

CONTENIDO

ABSTRACT	2
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
VIH Y SIDA: UN PROBLEMA MUNDIAL	3
VIH: EL VIRUS Y SU CICLO	4
CONTROL NATURAL DE LA INFECCIÓN.....	7
CCR5: el factor del huésped que protege de la infección	7
Control natural en la Cohorte del Banco de Sangre de Sydney (CBSS).....	9
EFECTOS DEL FACTOR VIRAL NEF EN LA INFECCIÓN	9
MATERIAL Y MÉTODOS	10
RESULTADOS	10
ESTRUCTURA Y VARIABILIDAD NEF	10
ESCAPE DEL SISTEMA INMUNE POR ACCIÓN DE NEF	13
FUNCIONES DE NEF EN LA INFECCIÓN	15
TRATAMIENTOS CON NEF	17
PERSPECTIVA	21
Ensayo de vacunación STEP	21
Virus “Nef- “como vector vacunal.....	22
REFERENCIAS	25

ABSTRACT

Many approaches have been tried to find a cure and an HIV vaccine. One of the molecules targeted to achieve a solution to this epidemic is Nef. This viral protein has been proved to alter cellular pathways in infected cells, interfere in the expression of surface receptors, and enhance viral replication and infectivity.

Nef structure and variability allows it to interact with multiple molecules of the host cells. Nef seems to have multiple ways of enhancing viral success depending on the stage of the cycle and the cell line it is infecting. It has been proved that deletion of functional Nef leads to decreased infectivity, viral load, and progression to AIDS. This protein has also been related to HIV evasion of immune responses targeting. The importance of Nef has been noted too when studying common ligands of this molecules, as CCR5, whose certain mutations can block HIV infection.

This project is a bibliographical review about Nef structure and function as well as the potentials uses of this knowledge in the creation of an effective vaccine or treatment to HIV infection.

Key words: HIV infection, Nef protein, HIV vaccine, AIDS.

RESUMEN

Se han probado muchos enfoques con el fin de encontrar una cura y una vacuna contra el VIH. Una de las moléculas seleccionadas para encontrar la solución a esta epidemia es Nef. Se ha comprobado que esta proteína viral puede alterar las rutas celulares en células infectadas, interferir en la expresión de receptores de superficie, y mejorar la replicación viral y la infectividad.

La estructura y variabilidad de Nef le confiere la capacidad de interactuar con múltiples moléculas de la célula hospedadora. Nef parece presentar múltiples formas de mejorar el proceso viral en función del momento del ciclo y la línea celular que esté infectando. Se ha demostrado que la delección de Nef funcional lleva a una disminución de la infectividad, la carga viral y la velocidad de progresión a la fase SIDA. Esta proteína también se ha relacionado con la evasión viral de las respuestas inmunes.

Este Trabajo de Fin de Máster es una revisión bibliográfica sobre la estructura de Nef y sus funciones, así como los potenciales usos de este conocimiento en la elaboración de vacuna o tratamiento efectivos contra el VIH.

Palabras clave: infección VIH, proteína Nef, vacuna VIH, SIDA.

INTRODUCCIÓN

VIH Y SIDA: UN PROBLEMA MUNDIAL

La prevalencia de VIH-1 y VIH-2 no ha dejado de aumentar (*Figura 1*), siendo el VIH-1 el que mayor distribución (*Figura 2*) y virulencia presenta.

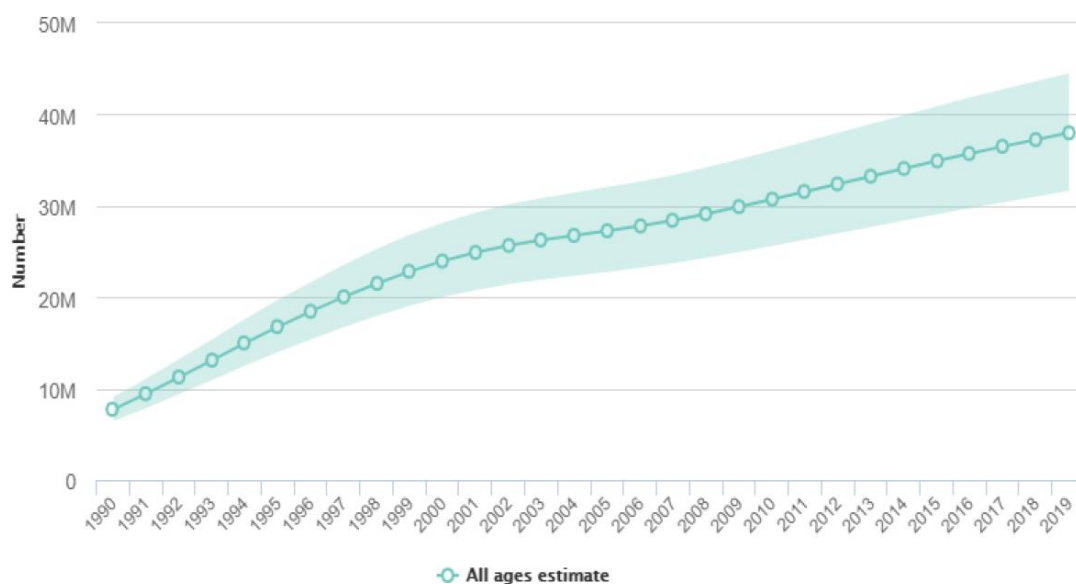


Figura 1. Progreso de la prevalencia de VIH desde 1990. En 2018 más de un millón y medio de personas contrajeron el VIH, llegando a haber una prevalencia de 37,9 millones. En este mismo año 770 mil personas murieron por enfermedades relacionadas con el SIDA. Recuperado de UNAIDS¹.

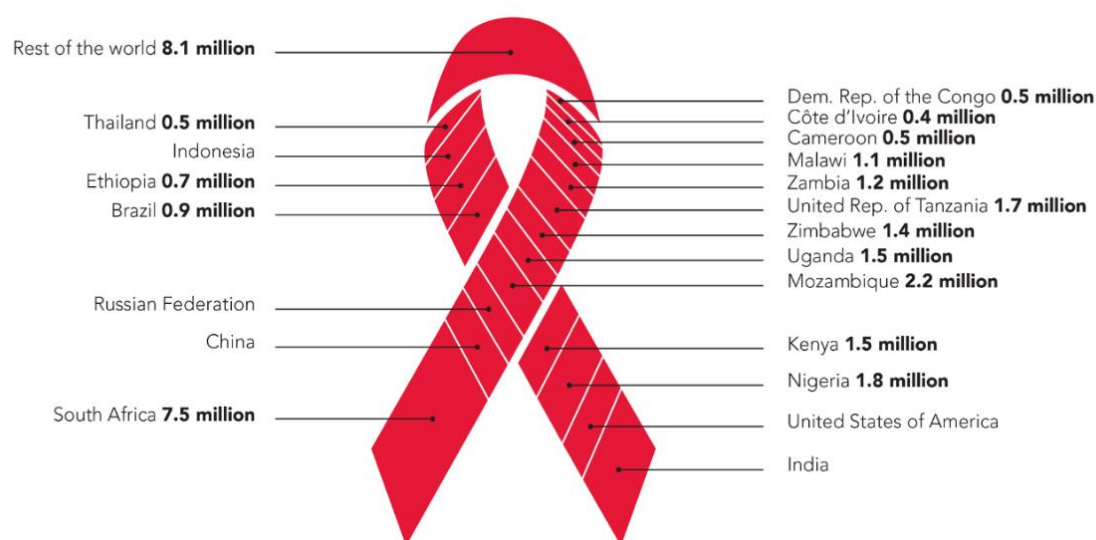


Figura 2. Distribución del VIH en diferentes países del mundo. Los esfuerzos de los programas de erradicación deben adecuarse a la situación específica de cada uno de los países afectados, pues la prevalencia es variable. Recuperado de UNAIDS¹.

El programa ONUSIDA, ha implantado la estrategia 90-90-90 (*Figura 3*) para acabar con la pandemia de SIDA para el año 2030. El objetivo de este programa era administrar tratamiento a 30 millones de personas para el año 2020 y disminuir la incidencia global al menos hasta 200.000 nuevos casos anuales para dejar de considerar al VIH un virus pandémico.

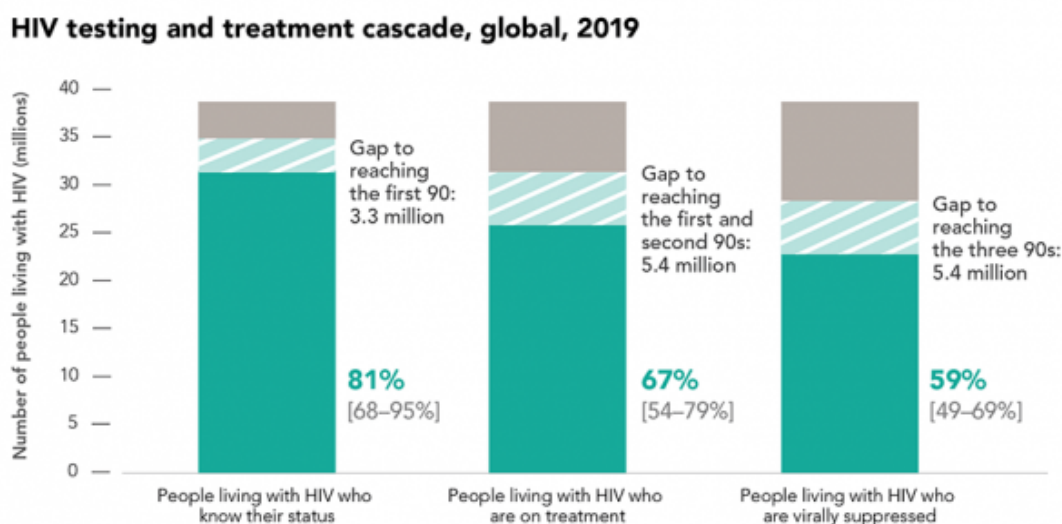


Figura 3. Progreso del programa 90-90-90 en 2019. Para 2020 el 90% de las personas que viven con VIH debían conocer su estado serológico, el 90% de los infectados debían recibir tratamiento antirretroviral, y el 90% de estos debía presentar una carga vírica indetectable. El margen que habría que salvar para cumplir los objetivos marcados para el 2020 se presentaba demasiado amplio. Recuperado de UNAIDS¹.

Una de las acciones clave para reducir la incidencia del VIH podría ser el uso de profilaxis pre-exposición (PreP) en poblaciones susceptibles.

Los tratamientos se basan en la administración de medicamentos que inhiben la transcriptasa reversa y enzimas proteolíticas. La terapia antirretroviral combinada (TARc), es capaz de reducir la viremia en plasma por debajo del umbral de detección (<50 copias ARN+ viral/ml de sangre) de las pruebas diagnósticas², las infecciones oportunistas y la mortalidad³. Una carga vírica indetectable impide la transmisión del VIH¹. Sin embargo, el VIH es capaz de replicarse en los linfocitos T CD4+ inactivos⁴ a pesar de que los niveles de viremia en plasma se supriman por la TARc por un largo período^{5,6}. Por ello, el cese de la terapia provoca un aumento de la viremia⁷.

VIH: EL VIRUS Y SU CICLO

Morfológicamente, partiendo del exterior hacia el interior, el VIH consta de envoltura lipídica, matriz y cápside (*Figura 4*). El genoma del VIH tiene 9 marcos abiertos de lectura (ORF). Tres de estos se corresponden con proteínas estructurales (Gag, Pol y Env) y el resto con proteínas reguladoras (Vif, Vpr, Tat, Rev, Vpu/Vpx, **Nef**) (*Tabla 1*).

Gen	Codifica	Función de la proteína codificada
Gag (<i>Group-specific antigen</i>)	Pr55*	Precursor de proteína de matriz (p17), cápside (p24) y nucleocápside (p7 y p9).
Pol (<i>DNA Polymerase</i>)	p1000*	Precursor de proteasa (p10), retrotranscriptasa y endonucleasa.
Env (<i>Envelope</i>)	gp160*	Precursor de gp120 y proteína transmembrana gp41.
Tat (<i>Transactivator of transcription</i>)	p14	Transcripción viral.
Rev (<i>Regulatory expression of viral protein</i>)	p19	Expresión de proteínas virales estructurales.
Nef (<i>Negative expression factor</i>)	p27*	Promueve infectividad e inhibe factores celulares.
Vif (<i>Virion infectivity factor</i>)	p23*	Contrarresta las acciones inhibitorias de los factores celulares.
Vpr (<i>Viral protein R</i>)	p15*	Promueve el transporte de complejos virales al núcleo del hospedador.
Vpu/Vpx (<i>Viral protein U/R</i>)	p16*	Promueve la madurez y liberación de la progenie viral desde la célula.

Tabla 1. Genes y productos correspondientes a los ORF del genoma de VIH. *Proteína precursora.

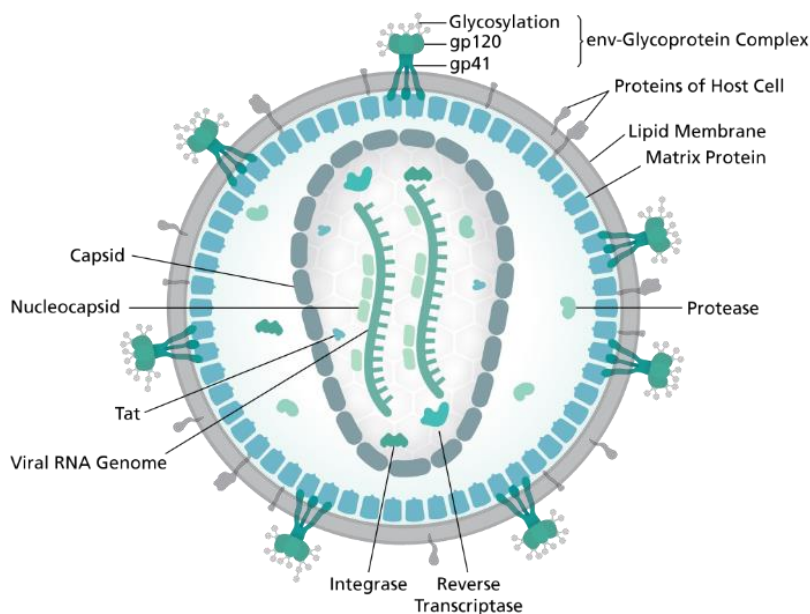


Figura 4. **Morfología del VIH.** La envoltura posee proteínas del huésped y glicoproteínas víricas. La matriz viral está formada por la proteína MA miristoilada. La proteína p24 forma la cápside (CA) o core, en cuyo interior se encuentran las enzimas y proteínas virales necesarias para armar el provirus (PR (proteasa viral), RT (retrotranscriptasa), IN (integrasa), y NC (proteína de nucleocápside)) y dos ARN+ de cadena simple, homólogos, pero no idénticos. Recuperado de SciStyle⁸.

El ciclo viral del VIH (*Figura 5*). comienza cuando la glicoproteína gp120 de superficie se une con la célula hospedadora a través de los receptores de CD4⁹. Desde el descubrimiento de los receptores de quimiocinas como correceptores de CD4, el tropismo de VIH viene determinado por el correceptor que emplea el virus para infectar. Las cepas de VIH X4, R5 y R5X4 trópicas utilizan los receptores de quimiocinas CXCR4, CCR5 o ambos receptores respectivamente⁹.

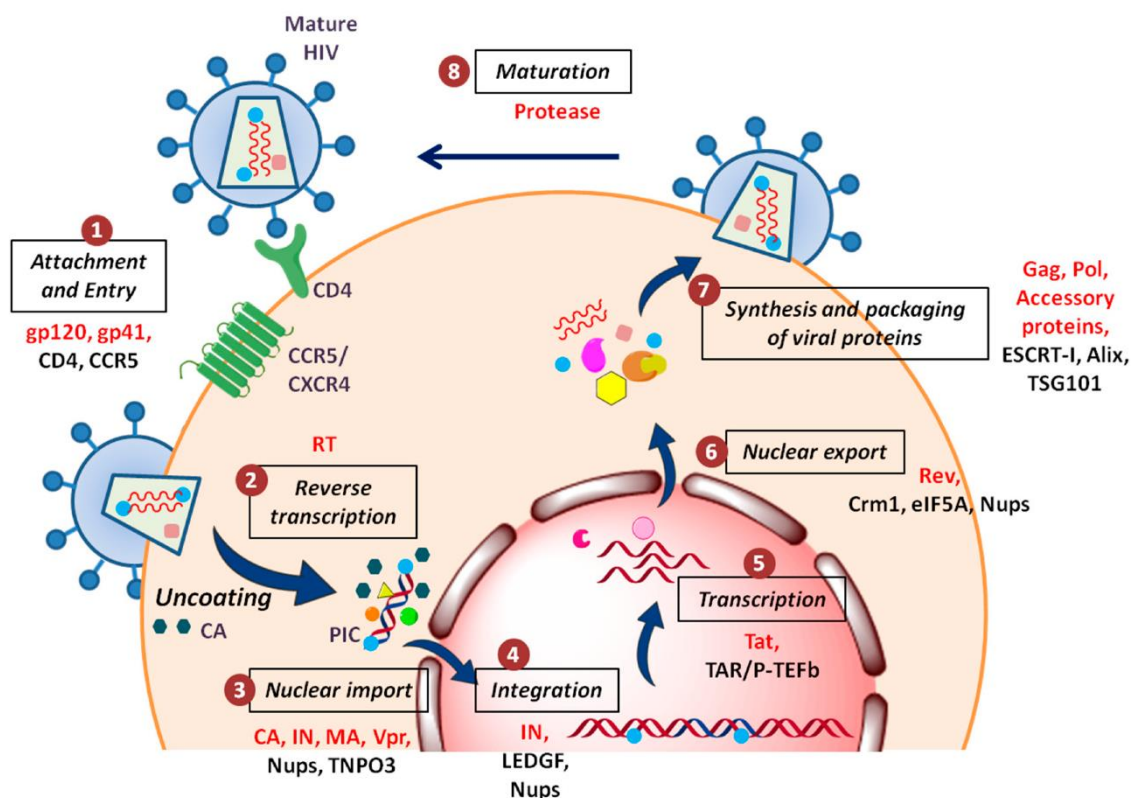


Figura 5. Ciclo viral del VIH. Gp120 se une a los receptores celulares de CD4 de linfocitos T y macrófagos fundamentalmente. Esto es necesario para la fusión de las membranas celular y viral, pero no es suficiente. Más adelante hablaremos de los correceptores necesarios junto a CD4. Una vez se encuentra el material vírico en la célula hospedadora, el genoma vírico se retrotranscribe y transporta al núcleo para incorporarse al genoma celular. Una vez formado el provirus, es necesario que la célula hospedadora esté activada para crear nuevas copias víricas. Extraída de Shukla et al.¹⁰.

De forma general, la primoinfección de VIH se debe a la entrada de VIH R5 en células CD4+ de las mucosas. Durante la infección aguda, el virus pasa a las células T activadas y la replicación del virus aumenta. Las células T se agotan mientras la respuesta inmune falla estableciéndose el estado persistente. Durante este estado los linfocitos CD4+ siguen disminuyendo, aunque la replicación es baja. La generación de variabilidad de

VIH provoca, eventualmente, una cepa de VIH más virulenta (normalmente X4) y la viremia aumenta a la vez que el recuento de células T disminuye⁹.

La proteína viral gp120 bloquea la unión normal de los ligandos (internalizando sus receptores) y desregula rutas intracelulares, llevando al agotamiento de las células T característico en enfermos de VIH¹¹⁻¹³.

CONTROL NATURAL DE LA INFECCIÓN

En el momento de establecerse una infección por VIH existen diversos factores que pueden determinar el éxito o fracaso de esta. Factores celulares son capaces de reducir el impacto de la infección o frenar por completo la misma. Por otro lado, algunas variaciones en el propio VIH pueden dificultar que se produzca la infección.

CCR5: el factor del huésped que protege de la infección

Uno de los correceptores del VIH-1 es CCR5. Las mutaciones homocigóticas en el gen CCR5 resultan en la pérdida funcional de dicho receptor en la superficie celular y confiere resistencia a la infección por el VIH, mientras que la posesión de la delección en un único alelo provoca que el curso de la enfermedad sea mucho menos progresivo^{14,15}. Se han descrito dos tipos de mutaciones en el gen de CCR5. Ambas mutaciones se corresponden con delecciones que se pueden observar en las [Figura 6 y 7](#). Los individuos homocigóticos para el gen CCR5Δ32 están altamente protegidos contra la infección, mientras que los heterocigotos adquieren una protección más limitada¹⁶⁻¹⁸.

Los pacientes de Berlín y Londres, únicos curados hasta la fecha del VIH, son muestra de la relevancia de este correceptor en la infección^{19,20}. Los pacientes de Berlín y Londres sufrían leucemia mieloide aguda y linfoma de Hodgkin respectivamente. Ambos fueron sometidos a trasplantes de médula ósea cuyos donantes eran homocigóticos CCR5Δ32/Δ32, es decir, resistentes a la infección por VIH. Tras más de dos años sin virus y en ausencia de medicación antirretroviral, los pacientes fueron declarados como curados^{21,22}.

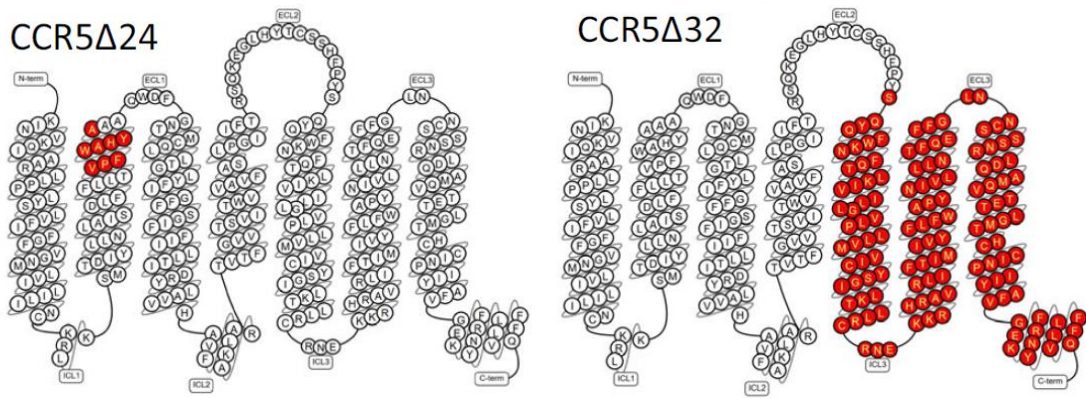


Figura 6. Topología de CCR5 en la que se resaltan en rojo las posiciones ocupadas por los residuos que no se encuentran en los mutantes CCR5Δ24 y CCR5Δ32. La delección heterocigota CCR5Δ24 también se ha relacionado con protección frente a la infección. Arendt et al.,²³.

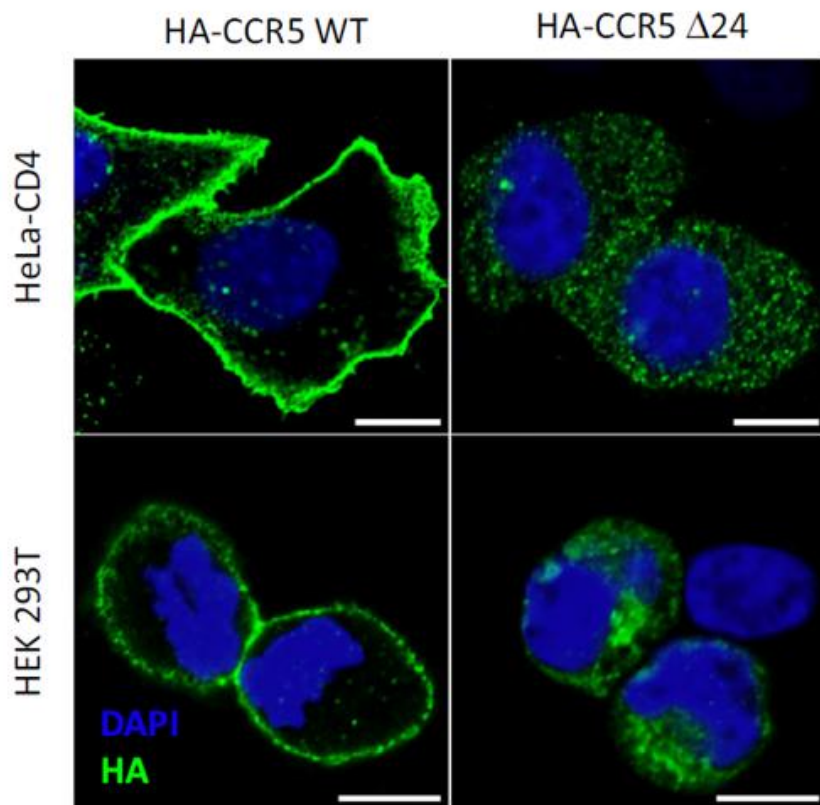


Figura 7. Imagen de inmunofluorescencia en la que se observa el mutante hCCR5Δ24 en verde. Esta mutación no es dominante negativa y permite la expresión de CCR5Δ24, pero de forma acumulada intracelularmente, lo que resulta en que CCR5 no se exprese en superficie, protegiendo de la infección por VIH a los individuos heterocigóticos CCR5Δ24. Arendt et al.,²³.

Control natural en la Cohorte del Banco de Sangre de Sydney (CBSS)

La CBSS está formada por individuos que contrajeron el VIH a raíz de una transfusión sanguínea, pero permanecieron asintomáticos durante años²⁴. Habían sido infectados por una cepa de VIH-1 menos virulenta, con una delección en la región terminal larga del gen *nef* (*nef*/LTR)²⁵.

Dentro de la CBSS los factores celulares del sujeto C135 han controlado la replicación del VIH durante más de 30 años en ausencia de terapia antirretroviral. El sujeto C135 es heterocigótico CCR5Δ32²⁶ y posee alelos HLA-B57²⁷⁻²⁹ y HLA-DRB1*13:02:01³⁰: variantes de diversos antígenos leucocitarios humanos (HLA) relacionados con una mejor respuesta celular y control de la viremia^{30,31}. Otros factores del hospedador que controlan la infección por VIH no presentes en el sujeto C135 son el HLA-B27³² o HLA-DRB1*13:03³³.

EFFECTOS DEL FACTOR VIRAL NEF EN LA INFECCIÓN

La proteína Nef del VIH tiene la capacidad de alterar las vías de señalización de las células que infecta, aumentar la infectividad del virus y disminuir la expresión de CD4, así como del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I del (CMH-I; MHC-I por sus siglas en inglés) en la superficie de la célula hospedadora. El MHC en humanos se denomina HLA, al que hemos hecho referencia en el punto anterior sobre el caso del CBSS.

Los simios infectados con VIS carentes de la proteína Nef muestran una menor carga viral³⁴. En humanos, el estudio de subgrupos de pacientes infectados con VIH carente de Nef reveló una menor carga viral y mayores ratios de asintomáticos de larga duración³⁵⁻³⁷. La simple expresión de Nef en ratas también desemboca en una patología similar al SIDA³⁸. Sin embargo, la ausencia de Nef en el VIH o VIS no previene la fase de SIDA^{25,39,40}. Nef no sería pues indispensable para el desarrollo de la fase SIDA, pero si promueve una alta carga viral³⁴.

Moléculas que bloqueen la acción de Nef son potenciales agentes terapéuticos⁴¹, por lo que parece ser una diana prometedora para combatir el VIH. A continuación, vamos a desarrollar los conocimientos existentes sobre Nef, así como su papel en la infección y posibles aplicaciones en el desarrollo de terapias.

MATERIAL Y MÉTODOS

La elaboración de este trabajo se basó en trabajos de revisión (“Reviews”) de referencia, obtenidos mediante la búsqueda bibliográfica en la base de datos PubMed (National Library of Medicine). Se utilizaron los términos de búsqueda MeSH: “HIV infection”, “HIV Nef”, “HIV vaccine”, “Nef vaccine”, “AIDS” con el uso del conector “AND”. En formato de vista resumen y por orden de fecha de publicación se seleccionaron publicaciones de los últimos 10 años. Se analizaron artículos y revisiones científicas, así como los documentos de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

RESULTADOS

La bibliografía científica recoge numerosas funciones de la proteína viral Nef. A continuación, se desarrollarán los conocimientos sobre estructura y variabilidad de Nef, así como sus funciones, los efectos de su ausencia y las terapias en las que Nef podría ser prometedor.

ESTRUCTURA Y VARIABILIDAD NEF

Nef consta de un núcleo globular flanqueado por un brazo N-terminal flexible y un lazo C-terminal desordenado⁴²⁻⁴⁶ (*Tabla 2 y Figura 8*).

Extremo N-Terminal	Estructuralmente flexible. Genéticamente variable. Zona de anclaje a la membrana. suele miristilarse y/o fosforilarse tras la transcripción (le confiere alguna de sus funciones).
Bucle flexible C-terminal	Más desordenado. Posee tres sitios de unión con vías endocíticas. Estructura muy variable. Longitud similar en todos los casos. Posible función como espaciador entre ciertos péptidos y el dominio nuclear.
Dominio nuclear plegado	Estable estructuralmente. Conservado genéticamente entre lentivirus de simios. Sitios de unión de mayoría de moléculas señalizadoras. Secuencia rica en prolina, P72xxP75 ⁴⁷ . Unión de diferentes quinasas (PAK) ⁴⁸ . Unión de TCR ⁴⁹ . Unión de tioesterasa humana ⁵⁰ . Unión de CD4 ⁴⁴ . Unión de Nef ⁵¹ .

*Tabla 2. Características y dominios de unión de las diferentes regiones de Nef. *Entre el extremo N-terminal y el dominio nuclear existe un punto de escisión de la proteasa viral.*

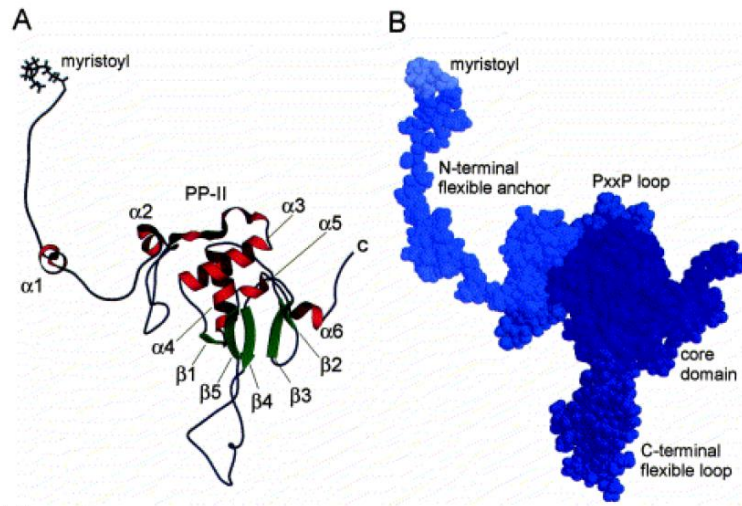


Figura 8. Modelo estructural de la proteína Nef miristiolada. (A) Representación de lazo (B) Representación de superficie molecular. Extraído de Geyer y Peterin⁴¹.

Aunque la estructura terciaria del dominio nuclear no pueda cambiar^{41,47}, los extremos N-terminal y el lazo C-terminal pueden ser modificados postranscripcionalmente para cubrir o exponer sitios de unión de diferentes ligandos en el dominio nuclear. A su vez, Nef puede adoptar tres conformaciones (Figura 9).

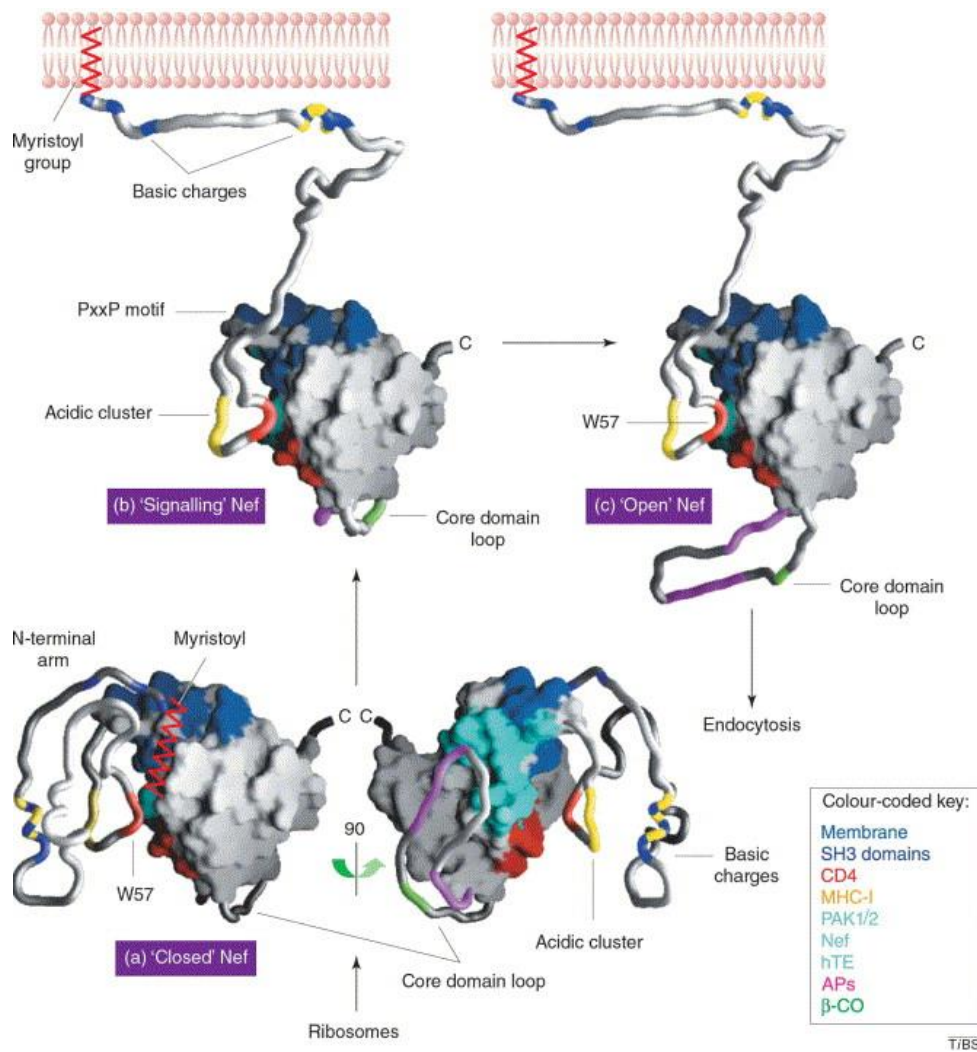


Figura 9. Representación de las diferentes conformaciones que puede adoptar Nef: (a) conformación cerrada; (b) conformación semiabierta; y (c) conformación abierta. El cambio conformacional de la forma cerrada a semiabierta de Nef permitiría a Nef anclarse a la membrana y exponer diferentes sitios de unión de moléculas señalizadoras. Una fosforilación o la interacción con una molécula diana apropiada podría generar un cambio de la conformación semiabierta a la abierta, lo que expondría el dominio nuclear. En su conformación cerrada Nef estaría protegida del clivaje proteolítico. Recuperado de Arold y Baur⁴⁷.

La capacidad de Nef de interactuar con muchas proteínas simultáneamente (Figura 9) le permite formar estructuras cuaternarias. Sin embargo, los sitios de unión para diferentes moléculas se encuentran en ocasiones superpuestos, por lo que la unión de una molécula inhibe la unión de otras. Nef tiene diferentes efectos en diferentes localizaciones en función del estadio en el que se encuentre el ciclo de replicación viral⁴⁷.

En todas las regiones de Nef podemos encontrar mutaciones, como se observa en la Figura 10, capaces de alterar sus funciones. La Tabla 3 muestra algunas de las mutaciones de la proteína Nef y sus efectos en las funciones de Nef.

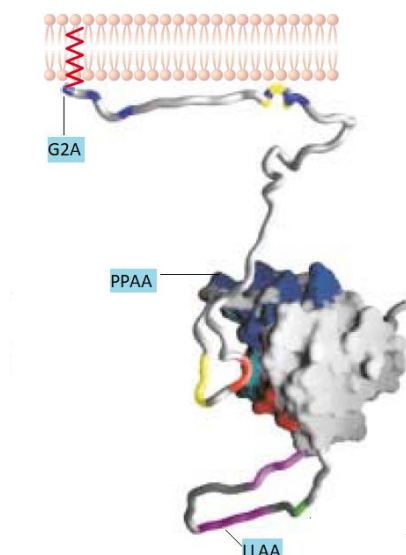


Figura 10. Estructura de la proteína Nef en la que se señalan las mutaciones Nef-G2A, Nef-PPAA y Nef-LLAA que se nombran en la tabla 1 y se encuentran en la región de anclaje a la membrana, el núcleo y el bucle flexible C-terminal respectivamente. Modificado de Arold y Baur⁴⁷.

Mutante	Efecto
Nef-G2A	Mutante no miristilado. Impide la unión de la proteína a la membrana plasmática.
Nef-EA	Se asocia con proteínas activadoras participantes en la internalización, reciclaje y degradación lisosomal.
Nef-LL/AA	Mutante en una dileucina (L164-L165). Dominio de endocitosis que interfiere en la internalización, reciclaje y degradación lisosomal.
Nef-PPAA	Mutante en una región rica de prolina (P72xxP75/Axx1). Interfiere en la interacción de Nef con SH2/3 y, por tanto, en la internalización de CD4 en algunas células.

Tabla 3. Algunos mutantes de Nef y funciones de la molécula a las que afecta la mutación.

ESCAPE DEL SISTEMA INMUNE POR ACCIÓN DE NEF

Nef provoca la internalización de receptores clave como MHC-I, MHC-II (del inglés; Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II), CD4, CCR5 y CXCR4. Así, esta proteína es capaz de alterar tanto la respuesta inmune adaptativa como la innata.

Por un lado, esta proteína disminuye la expresión de MHC-I⁵², impidiendo así la eliminación de las células infectadas por CTL⁵³. Esta acción requiere de la formación de un complejo trimolecular formado por Nef, MHC-I y AP-1 (proteína activadora 1 de la

transcripción)⁵⁴. Existen dos posibles mecanismos, mostrados en la *Figura 11*, por los que Nef podría disminuir el MHC-I en superficie.

De una manera muy similar a la degradación de MHC-I, Nef es capaz de internalizar CD4 (*Figura 11*). Esto parece deberse a la interacción de Nef con β -COP^{55,56}. De esta manera, se impide la superinfección y la muerte prematura de las células infectadas⁵⁷.

Nef disminuye la expresión de MHC-II tanto eliminándolo activamente de la membrana plasmática como impidiendo su transporte anterógrado a esta⁵⁸⁻⁶¹.

Nef también altera la respuesta innata afectando la actividad de las células NK. Para establecer una infección sistémica y con reservorios virales es necesario impedir la acción de las células NK. El MHC-I inhibe la activación de estas células con actividad citotóxica, por lo que la internalización de MHC-I por parte de Nef debería provocar una respuesta inmune citotóxica. Parece que Nef actúa sobre diferentes ligandos de las células NK y disminuye así su actividad citotóxica⁶²⁻⁶⁵. La proteína Nef inhibe también la activación de las células NKT uniéndose a su CD1d y degradándola en estructuras endosomales⁶⁶⁻⁶⁹.

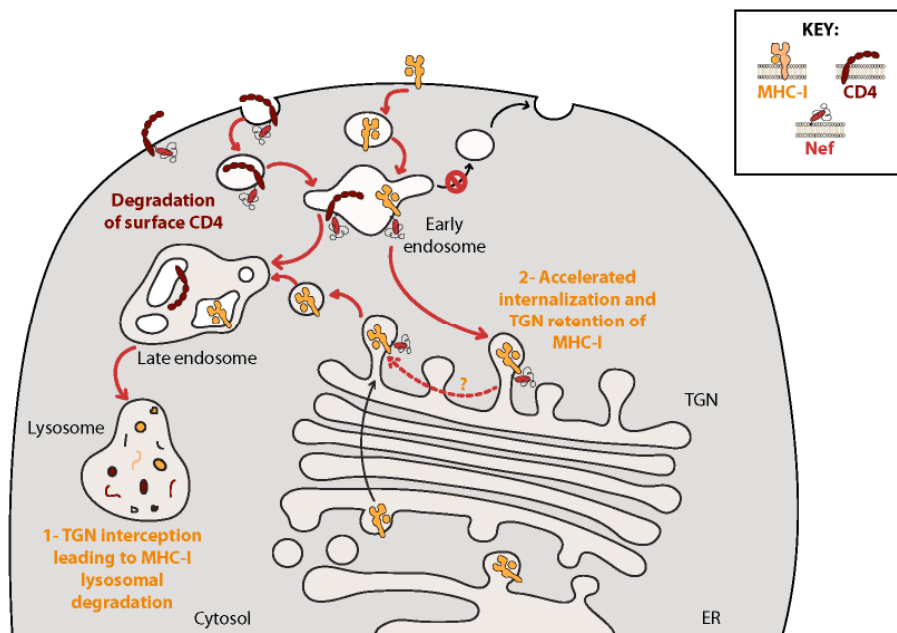


Figura 11. Representación esquemática de la acción de Nef sobre MHC-I y CD4. Se muestran los dos mecanismos por lo que Nef internaliza el MHC-I: (a) Nef bloquea la externalización de MHC-I inmaduro al salir de la red del trans-Golgi y lo dirige a vesículas con β -COP (subunidad β del coatómero de Golgi participante en su gemación y tráfico vesicular) donde es degradado⁷⁰, o (b) Nef provoca la eliminación activa de MHC-I de la membrana plasmática a través de la activación de quinasas de la familia Scr⁷¹⁻⁷⁶. Estos dos mecanismos no son excluyentes y es bastante probable que Nef utilice ambos en función de la situación o el tipo celular⁷⁴. Estos mecanismos son también similares a los utilizados para internalizar y degradar otros receptores. Extraído de Sudgen et al.⁷⁷.

FUNCIONES DE NEF EN LA INFECCIÓN

Aunque Nef no posea actividad enzimática puede interactuar con numerosos factores del hospedador, algunos de los cuales podemos observar en la [Tabla 4](#). Esto le permite utilizar la maquinaria de tráfico vesicular y alterar la señalización celular normal⁷⁸.

Molécula	Efecto de la interacción con Nef
CD4	Aumento de infectividad y replicación en células CD4+. Evita superinfección y respuesta inmune.
HLA clase I (es el MHC-I en humanos)	Prevención del efecto de células T citotóxicas.
FasL	Apoptosis células T citotóxicas.
Complejo TCR/CD3	Disminución del reconocimiento antigénico.
CD28	Disminución del reconocimiento antigénico. Posible papel en latencia.
Tirosín-kinasas	Modificación del umbral de activación de linfocitos.
Cofilina	Bloqueo de la reordenación del citoesqueleto y movilidad celular.
BST2	Promoción la liberación y dispersión de partículas virales.
DNM2	Aumento de la infectividad.
HDAC6	Aumento de la replicación y de la infección. Aumento de la unión de Gag a la membrana plasmática y estabilización de Vif.
SERINC	Aumento de la infectividad.

Tabla 4. Algunas moléculas del hospedador con las que Nef interactúa y efectos de dicha interacción.

El efecto más relevante y conocido de Nef es la mejora de la infectividad. Se trata de una característica altamente conservada en lentivirus de primates⁷⁹⁻⁸¹. La alta presión selectiva sobre Nef durante la progresión de la enfermedad⁸² apoya su papel intensificador de la infectividad.

El requerimiento de Nef para conseguir una infectividad óptima es muy variable y depende del tipo celular en el que se produzcan los virus⁸³. Para que se produzca el efecto de Nef en la infectividad es necesario que esta se exprese en la célula productora⁸⁴. Al ser Nef incorporada a las partículas virales y procesada por la proteasa del VIH-1 durante la maduración del virión, se piensa que puede tener un rol específico en las etapas iniciales de la replicación⁸⁵⁻⁸⁷.

Dos artículos de Laguette *et al.*⁸⁸ y Qi y Aiken⁸⁹ sugieren que el papel de Nef en la biogénesis es la causa de su efecto sobre la infectividad. Esto está en consonancia con la incapacidad de mejorar la infectividad de virus carentes de Nef (Nef-), expresando Nef

en la célula diana^{84,90}. Otra posibilidad contemplada es que el efecto de Nef sobre la infectividad se deba a modificaciones post-translacionales dependientes de Nef de las proteínas víricas.

Se ha confirmado utilizando diversos tipos celulares, células diana y clones moleculares virales^{84,91-96} que VIH-1 incapaz de expresar Nef tiene menores tasas de infectividad que su contraparte⁹⁷.

La distinta infectividad de los virus Nef+ y Nef- puede deberse a que Nef secuestra las rutas celulares de las células productoras de virus para en última instancia optimizar la infectividad. Luego, las rutas celulares de las células diana podrían favorecer a los virus Nef+ en etapas primarias del ciclo viral. También existe la posibilidad de que Nef reclute cofactores o también de que contrarreste factores inhibitorios como hacen Vif, Vpu y Vpx.

Los virus Nef+ tienen mayor eficiencia tras la entrada que su contraparte^{84,97,98}. Se ha sugerido la existencia un bloqueo de las cápsidas tras la entrada que Nef (o las modificaciones debidas a esta) contrarresta. Un posible efector de este bloqueo puede ser la red cortical de actina puesto que los medicamentos dirigidos a esta molécula disminuyen la infectividad en virus Nef-, pero no así en virus Nef+⁹⁹.

La transcriptasa reversa compensa el efecto de Nef en la infectividad¹⁰⁰. Debido a la relación de dependencia entre la RT y la descomposición de la cápside (proceso de "uncoating"), Nef podría afectar a cualquiera de dichos mecanismos^{101,102}. Aunque Nef no muestra efecto sobre el proceso de "uncoating" *in vitro*, no se puede descartar un efecto *in vivo*¹⁰³.

Brugger *et al.*¹⁰⁴ identifica diferencias de composición lipídica entre virus Nef+ y Nef-. Los distintos perfiles lipídicos de VIH Nef+ y Nef- muestran que la expresión de Nef en las células productoras afecta de alguna forma a la biogénesis viral.

Las diferencias proteicas por otro lado se han relacionado con la expresión diferencial de determinadas proteínas según se expresara o no Nef en las células productoras de virus. Entre estas se encuentran Ezrina y EHD4, que tienen una menor expresión en virus Nef+. Se plantea que estas moléculas son secuestradas por Nef en el proceso de aumentar la infectividad, evitando su incorporación a los viriones, y pueden ser cofactores en el aumento de la infectividad por parte de Nef¹⁰⁵.

También se ha documentado un efecto de Nef en la síntesis de ADNc en las células diana. Este ADN circular se forma por efecto de una ligasa que crea un enlace covalente entre ambos extremos del ADN. Los virus Nef+ producen más cantidad de productos de transcripción reversa que los virus Nef-. Esto apoya un efecto de Nef entre la fusión y la traslocación de ADN viral al núcleo^{84,98}.

Para dilucidar qué papel tiene Nef en el aumento de la infectividad se han estudiado mutantes de VIH-1 con Nef que no interactúa con la dinamina 2. Esta molécula es necesaria para la biogénesis de vesículas intracelulares y su interacción con Nef es requerida para aumentar la infectividad¹⁰⁶. También es necesaria la endocitosis mediada

por clatrina, pues si se silencia el gen de la clatrina la infectividad no se ve mejorada⁸³. Se hace patente el papel fundamental que tiene la capacidad de Nef de alterar el tráfico vesicular para mejorar la infectividad del VIH.

TRATAMIENTOS CON NEF

La bibliografía deja claro que Nef, como factor patogénico con propiedades pleiotrópicas, es una molécula vital en la patogénesis viral. Sin embargo, existen numerosas incógnitas en cuanto a los mecanismos por los que Nef provoca sus numerosos efectos. A pesar de ello, muchos estudios tratan de aprovechar el papel decisivo de Nef en la infección para el desarrollo de diversos tratamientos. Así, Nef se ha probado como proteína recombinante e inmunógeno, en diferentes estrategias anti-VIH.

Una vacuna MVA-nef fue testada en infectados de VIH crónicos por Cosma *et al.*¹⁰⁷. Previa a la vacunación, al estimularse con Nef, se observó un desequilibrio entre la respuesta de linfocitos T CD8 y linfocitos T CD4. Mientras la respuesta de las células T CD8 era normal, la respuesta de las células T CD4 fue indetectable. La respuesta de linfocitos T CD8 es vital en el control de la fase aguda de la infección tanto por VIH en humanos^{108,109} como por VIS en primates^{110,111}. Por otro lado, la respuesta de linfocitos T CD4 es de mayor importancia en la fase crónica de pacientes no progresores a largo plazo^{112,113} y de pacientes sometidos a TARc¹¹⁴.

Respecto a la respuesta celular, el estudio de Cosma *et al.*¹⁰⁷ tras tres vacunaciones sucesivas con MVA-nef, la respuesta de linfocitos T CD4, medida como producción de IFN- γ , fue detectada en la mayoría de los pacientes (80%) (*Figura 12*). El vector MVA-nef mejora la respuesta inmune CD4 específica de Nef. Además, la vacunación puede aumentar la frecuencia relativa de linfocitos T CD4 específicos para Nef. Sin embargo, la estimulación de la respuesta inmune CD8 específica para Nef no se ve prácticamente afectada. La respuesta humoral también se vio afectada por la administración de la vacuna. Aumentaron los títulos de IgG contra Nef recombinante en una minoría de los pacientes (20%) mientras que en el resto se mantuvo estable. El número de epítomos capaces de reconocer las células T CD4+ aumentó en cuatro pacientes (*Tabla 5*).

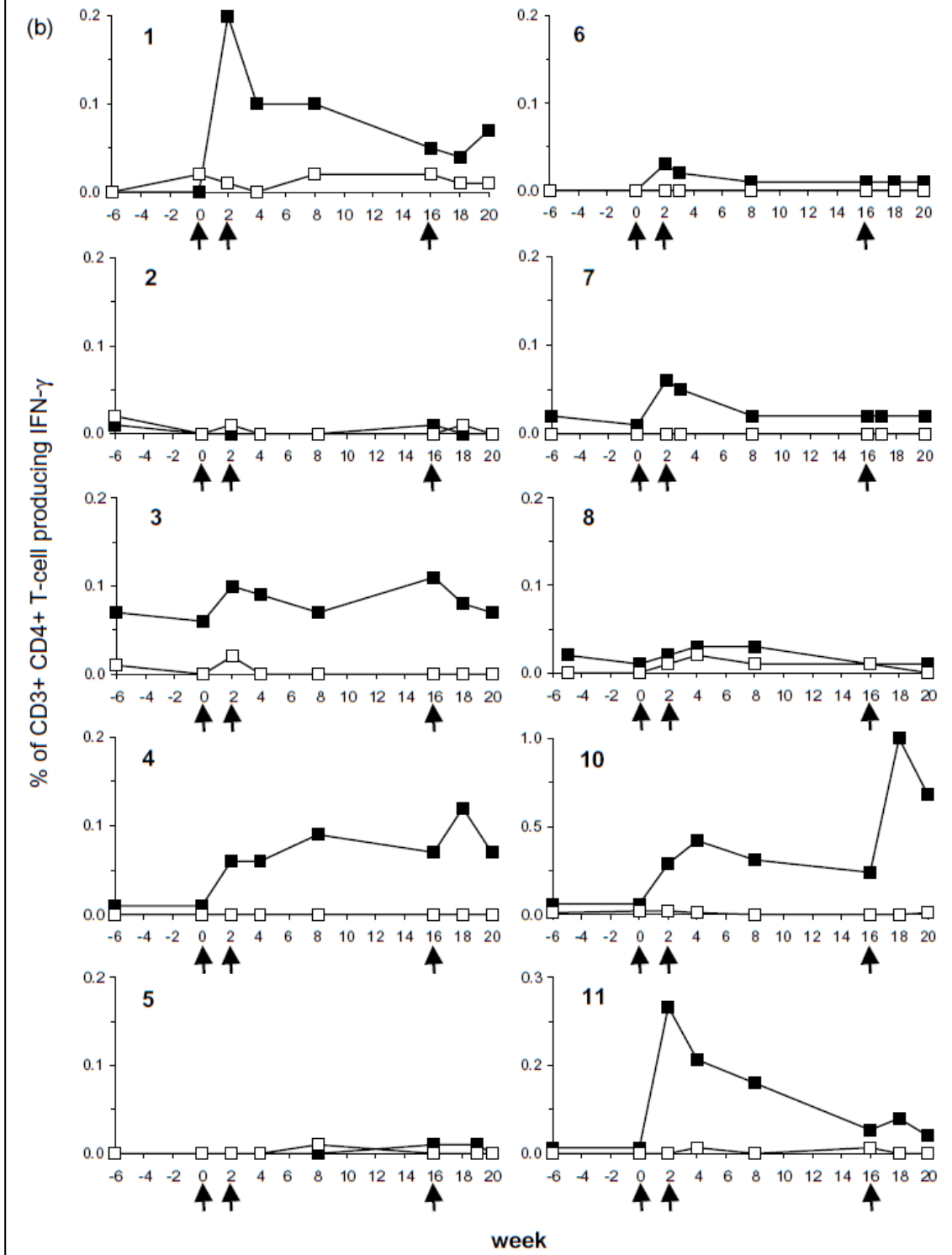


Figura 12. Respuesta CD4 medida como producción de IFN- γ de los once pacientes (1-11) desde seis semanas antes de la vacunación hasta semana 20 desde la primera dosis. La vacunación se efectuó en las semanas 0, 2 y 16. Extraído de Cosma et al.¹⁰⁷.

Epitope mapping				
Subject	0 ^a	I ^a	II ^a	III ^a
Epitopes targeted by the Nef-specific CD4 immune response ^b				
3	82–101	82–101		82–101
4	–		82–101	82–101 182–201
10	112–131		112–131 12–31 102–121	112–131 12–31 102–121
11	–		102–121 112–131	102–121 ^c 112–131 ^c

^a Epitopes recognised before the MVA-nef vaccination (0); after the first immunisation at week 2 (I); after the second at week 4 or 8 (II); and after the third at week 18 or 20.

^b Epitopes location is given according to the HIV-1_{LAI}-Bru Nef sequence (accession number K02013).

^c This epitope mapping has been performed at week 16.

Tabla 5. Reconocimiento de epítomos de Nef por células T CD4+. Modificado de Cosma et al.¹⁰⁷.

Comparaciones usando constructos de ADN de Nef-Vpr-Gp160-P24 con constructos de Nef, muestran que Nef-Vpr-Gp160-P24 podría ser un candidato vacunal muy prometedor¹¹⁵. En este estudio se ha utilizado estrategias de tipo *prime/boost* en las que el sistema inmune se estimula inicialmente con una vacuna y posteriormente se estimula con antígenos homólogos o heterólogos (*Figura 13*).

Se estudió la respuesta de anticuerpos, citoquinas y Granzima B. En cuanto a la respuesta de anticuerpos, se observó una mayor eficiencia con grupos heterólogos y grupos homólogos de proteína/polipéptido comparado con grupos homólogos de ADN (*Figura 14*). Además, la ratio distintas IgG indicaba una tendencia hacia respuestas inmunes celulares. Esta misma tendencia se observó en las ratios de citoquinas. El aumento de la producción de Granzima B (*Figura 15*) también indicó actividad de linfocitos T citotóxicos¹¹⁵. Estos estudios muestran que el polipéptido anterior es capaz de promover la respuesta inmune de una manera similar a la proteína Nef, pero con la ventaja de que el polipéptido se conserva mejor y ha mostrado menos efectos secundarios¹¹⁵.

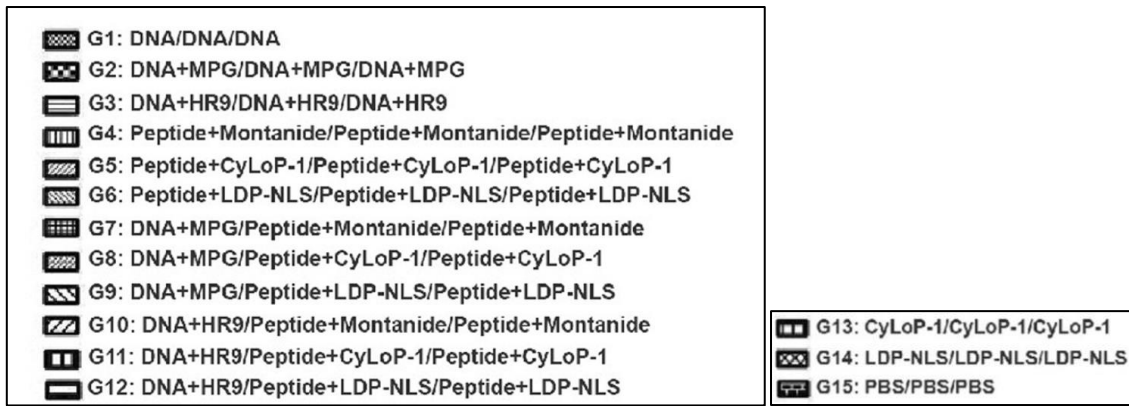


Figura 3. Diferentes tratamientos llevados a cabo en el experimento: homólogos de ADN (G1-G3), péptidos homólogos (G4-G6), heterólogos de ADN y péptidos (G7-G12), y controles (G13-G15). Cada tratamiento consta de tres administraciones separadas con barras. Extraído de Davoodi et al.¹¹⁵.

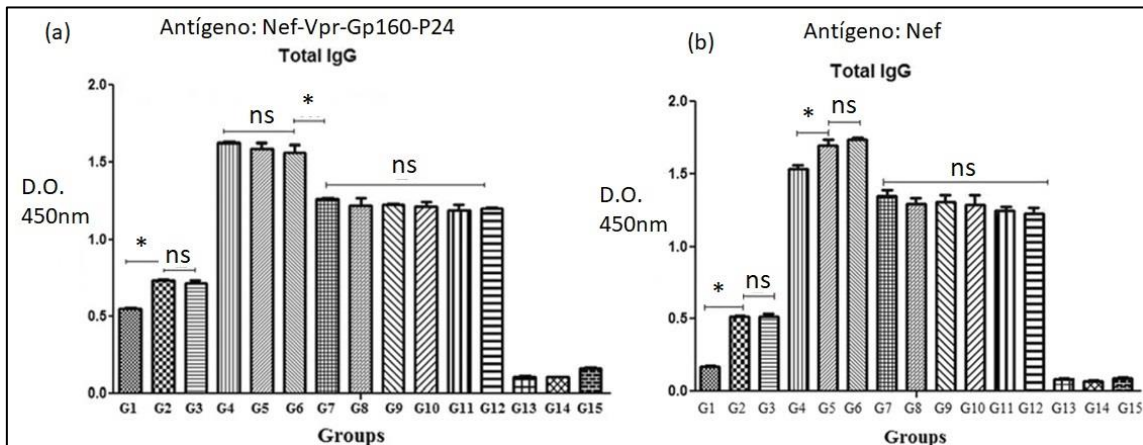


Figura 14. Niveles de IgG totales en ratones inmunizados con Nef-Vpr-Gp160-P24 (a) y Nef (b). Modificado de Davoodi et al.¹¹⁵.

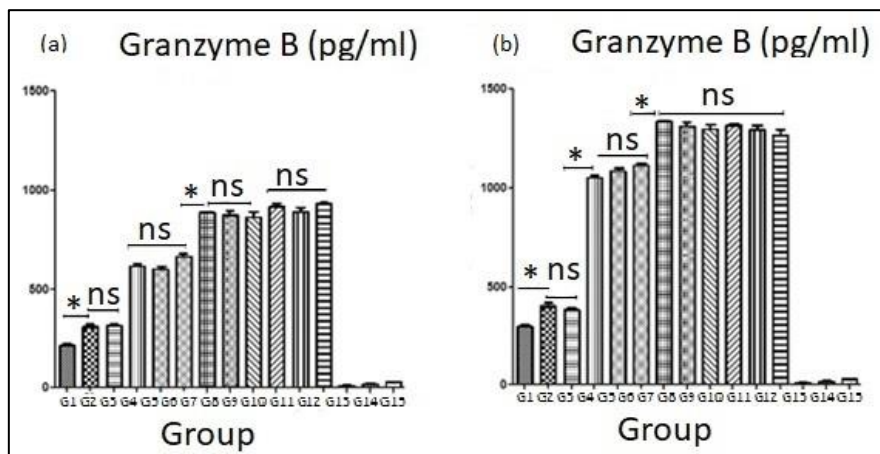


Figura 15. Secreción de Granzima B en ratones inmunizados con Nef-Vpr-Gp160-P24(a) y Nef (b). Modificado de Davoodi et al.¹¹⁵.

PERSPECTIVA

Además de los ya nombrados, uno de los campos más prometedores en la biomedicina es la ingeniería genética. El uso de la biotecnología para modificar el material genético de huésped, patógeno o vector ha probado ser de gran utilidad a la hora de desarrollar tanto tratamientos como diagnósticos de diversas enfermedades. El caso del VIH no es diferente, y numerosos ensayos, algunos de los cuales se tratarán a continuación, han utilizado estas técnicas para intentar acabar con las infecciones de VIH.

Ensayo de vacunación STEP

Muchos esfuerzos a la hora de crear una vacuna contra el VIH-1 se han centrado en el papel de las células T CD8+ en controlar la replicación viral, tanto con VIH^{108,109,116} como con VIS¹¹⁷⁻¹¹⁹. Uno de los primeros ensayos vacunal de referencia se denominó STEP, donde se probó la vacuna MRKAd5 HIV-1 Gag/Pol/Nef. Esta vacuna utilizó un adenovirus como vector para trasladar los genes de tres moléculas del VIH: Gag, Pol y Nef. A pesar de que se mostraron respuestas de células T CD8+, fue ineficaz a la hora de reducir la carga viral o evitar la adquisición del virus^{120,121}.

Sin embargo, un dato interesante que se obtuvo de este ensayo fue que los pacientes vacunados de STEP tenían más probabilidades de tener epítomos diferentes a los de la vacuna¹²². Es posible que la respuesta de Linfocitos T citotóxicos (CTL) activada por la vacuna genere una presión selectiva sobre el virus. Esto haría que los virus con epítomos distintos a los de la vacuna se transmitieran preferentemente. La respuesta de CTL también podría generar escapes virales más frecuentemente, lo que crearía una mayor divergencia respecto a la cepa de la vacuna.

La vacunación STEP modula la respuesta de las células T que inicialmente se dirigen a Nef. Esto indica que las células T Nef-específicas fueron sensibles a la vacunación. Como consecuencia, la diversidad de epítomos de Nef en pacientes vacunados fue mayor (*Tabla 6*). Se demostró además que esta diversidad no estaba relacionada con la duración de la infección (*Figura 16*).

CD8 ⁺ T-cell epitopes showing significant difference ($P < 0.10$) in epitope diversity between STEP vaccine and placebo groups.			
Epitope	Average epitope diversity in vaccinated patients (%)	Average epitope diversity in placebo patients (%)	P value
EVGFPVRPQVPL (Nef ₆₅₋₇₆)	0.67	0.083	0.038
RERMRAEP (Nef ₁₇₋₂₅)	1.31	0	0.065
HPMSQHGIE (Nef ₁₆₆₋₁₇₄)	1.07	0.22	0.065
EDPEKEVLEWR (Nef ₁₇₄₋₁₈₄)	1.33	0.30	0.083

Tabla 6. Epítomos de células T CD8⁺ cuya diversidad es mayor en vacunados con STEP. Extraído de Park et al.¹²³.

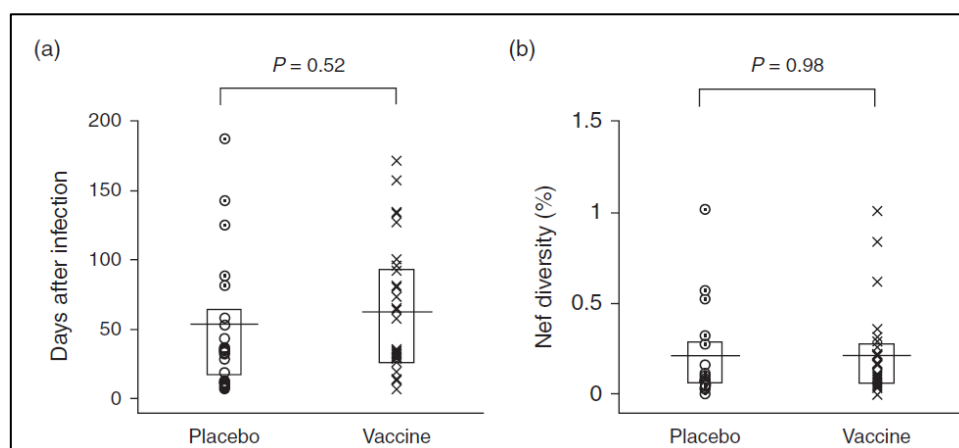


Figura 4. Comparativa de duración de la infección (a) y diversidad de epítomos de Nef (b) en pacientes vacunados y grupo placebo. La diferencia de duración no es significativa ($P=0,52$) mientras que la de diversidad sí lo es ($P=0,98$). Extraído de Park et al.¹²³.

Park et al.¹²³ propone producir respuestas de células T Nef-específicas inmunizando con epítomos de Nef mutantes que fueran inmunodominantes, en lugar de con la forma más prevalente, para prevenir así el escape viral generado por la respuesta de células T.

Virus carentes de Nef como vector vacunal

Al crear una vacuna atenuada del VIH existen dos retos que superar: la dificultad de producción masiva de virus, y los problemas de seguridad asociados a dicha producción. Algunos equipos, además de inactivar química y físicamente el virus, han eliminado el gen *nef* para disminuir los riesgos de la vacuna¹²⁴.

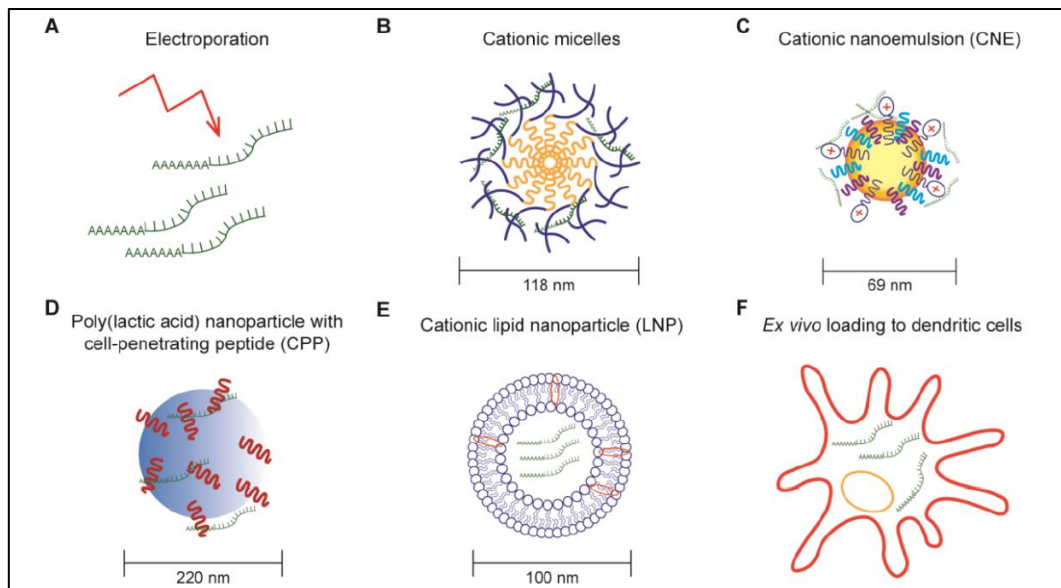
Diversos estudios han demostrado una fuerte inmunidad protectora tras la vacunación con virus *nef* defectivos como SIVmac239 Δ *nef* y SIVmac239 Δ 3^{125,126}. Además de utilizar virus *Nef* defectivos como vector vacunal, se propone la utilización de inhibidores moleculares de *Nef* como adyuvantes en la creación de vacunas¹²⁷.

Se ha sugerido que la protección observada tras la vacunación con VIH y VIS se debe a la competición por células diana entre el virus atenuado y la forma salvaje. Esta posibilidad ha sido refutada con vacunas de virus atenuados en macacos¹²⁸. Ocho macacos se inocularon con Δ *nef*-RT-SHIV. Antes de la inoculación de los macacos vacunados con el virus salvaje, se utilizaron antirretrovirales para eliminar el virus atenuado. Se comprobó que los niveles de viremia en los animales vacunados fueron significativamente más reducidos que en el grupo control¹²⁸.

Estos son solamente algunos ejemplos de ensayos que han utilizado la ingeniería y la modificación genética para acabar con el VIH. En general, parece que la biotecnología de los ácidos nucleicos permite desarrollar tratamientos con mayor eficacia y menores efectos secundarios que los tratamientos farmacológicos tradicionales. Sin embargo, el potencial terapéutico que tienen estas técnicas debe seguir estudiándose para poder generalizar estos tratamientos y, sobre todo, para cerciorar que su uso es seguro y efectivo.

Es razonable postular que la caracterización funcional del gen *nef* del VIH y, en particular, la pérdida de función relacionada con ciertas de sus mutaciones o con su delección completa podrían ser de utilidad e importantes para el desarrollo de una nueva generación de vacunas "vivas atenuadas" para inmunizar frente al VIH. En este sentido, se ha postulado que las vacunas contra el VIH empleando un virus atenuado, o con el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) atenuado como modelo más próximo, podrían ser extremadamente efectivas para proteger contra la infección con cepas de tipo salvaje. Sin embargo, esta herramienta viral puede no ser completamente segura, como se ha constatado en ciertos estudios con cepas virales atenuadas de VIS que han causado enfermedad (SIDA) en algunos individuos animales vacunados^{40,129-134}. Así, el uso de virus VIH carentes de *nef* y no funcionales que permitan el control de viremia y la patogénesis asociada a la infección, puede ofrecer un nuevo escenario para el desarrollo de vacunas con virus atenuados seguros.

Estas propuestas no invalidan la utilidad de *Nef* como inmunógeno, estrategias de vacunación con ARN mensajero para producir la proteína o *Nef* recombinante. La efectividad en la estimulación del sistema inmune y seguridad ya se ha probado en con otras proteínas del VIH (*Tabla 7*) y otros virus. Tanto es así que las dos primeras vacunas utilizadas clínicamente contra el SARS-CoV-2 fueron vacunas de ARNm.



Delivery technology	Component	mRNA type	<i>In vitro</i> test	<i>In vivo</i> test	HIV-1 immunogen tested	Summary
Electroporation	N.A.	saRNA; no nucleoside modification	DCs	Mice	gp140 Env trimer	Env-specific antibody and T cell responses higher than naked saRNA
Cationic micelles	Stearic acid, PEI	Non-amplifying RNA; no nucleoside modification	DC2.4; Bone marrow-derived DCs	Balb/c	Gag	Induces BMDC maturation; Gag-specific IgG titers and Gag-specific T cell responses
Cationic nanoemulsion (CNE)	Tween 80, Span 85, DOTAP, squalene	saRNA; no nucleoside modification	N.A.	Rabbit; Rhesus macaque	gp140 Env trimer	Induces serum IgG titers and neutralization titers with low dose immunization
PLA nanoparticle with CPP	PLA CPP	Non-amplifying RNA; no nucleoside modification	Monocyte-derived DCs	N.A.	Gag	Induces moDC maturation and the secretion of pro-inflammatory cytokines
Cationic lipid nanoparticle (LNP)	Cationic lipid, PEG, cholesterol, phospholipid	Non-amplifying; nucleoside-modified	N.A.	Rabbit; Rhesus macaque	gp140 Env trimer	Tier 2 neutralizing titers elicited in some animals; antigen-specific CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T cell response
<i>Ex vivo</i> loading to dendritic cells	Autologous-derived DCs	Various	Monocyte-derived DCs	Mice	Various	Induces moDC maturation and cytotoxic T cells in mice

Tabla 7 (con esquemas explicativos). Diferentes técnicas de administración de ARNm que han sido ensayadas con proteínas del VIH. Los inmunógenos utilizados son gp140, Env, y Gag en distintas formas. Las técnicas de administración son electroporación (A), micelas catiónica compuestas por ácido esteárico y polietilenimina (B), nanoemulsiones catiónicas (C), nanopartículas de poli(ácido láctico) con péptidos de penetración celular (D), nanopartículas lipídicas catiónicas (E), y carga *ex vivo* de células dendríticas (F). En la última columna se muestra un resumen de los resultados obtenidos en cada ensayo. Extraído de Mu et al.¹³⁵.

REFERENCIAS

- [1] UNAIDS. (2021). UNAIDS. Recuperado en 2021, de <https://www.unaids.org/en>
- [2] Ho D.D., Neumann A.U., Perelson A.S., Chen W., Leonard J.M., Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373 (6510): 123–6.
- [3] Palella Jr F.J., Delaney K.M., Moorman A.C., *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV outpatient study investigators. *NEJM* 1998;338(13):853–60.
- [4] Finzi D., Hermankova M., Pierson T., *et al.* Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997;278(5341):1295–300.
- [5] Zhang L., Ramratnam B., Tenner-Racz K., *et al.* Quantifying residual HIV-1 replication in patients receiving combination antiretroviral therapy. *NEJM* 1999;340(21):1605–13.
- [6] Ramratnam B., Mittler J.E., Zhang L., *et al.* The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nat Med* 2000; 6 (1): 82–5.
- [7] Davey Jr R.T., Bhat N., Yoder C., *et al.* HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96 (26): 15109–14.
- [8] Splettstoesser (2014). SciStyle – Scientific illustration and animation. Recuperado en 2021, de <https://www.scistyle.com/>
- [9] Levy J.A. HN and the pathogenesis of AIDS, 2nd edn. *ASM Press*, Washington D C, 1998.
- [10] Shukla E., Chauhan R. Host-HIV-1 Interactome: A Quest for Novel Therapeutic Intervention. *Cells*. 2019; 8 (10): 1155. <https://doi.org/10.3390/cells8101155>
- [11] Hewson T., Lone N., Moore M. *et al.* Interactions of HIV-I with antigen-presenting cells. *Immunol Cell Biol*, 1999; 77: 289-303.
- [12] Norcross M.A. Chemokine receptors and HIV- I pathogenesis: a viral fatal attraction. In: Dalgleish A., Weiss R (eds) HN and the new viruses, 2nd edn. *Academic Press*, New York, 1999.
- [13] Cottrez F., Manca F., Dalgleish A.G. *et al.* Priming of human CD4(+) antigen-specific T cells to undergo apoptosis by HIV-infected monocytes - a two-step mechanism involving the gp120 molecule. *J Clin Invest*, 1997; 99: 257-266.
- [14] Michael N.L., Chang G., Louie L.G. *et al.* The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV- I transmission and disease progression. *Nat Med*, 1997; 3: 338-340.

- [15] Michael N.L. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Curr Opin Immunol*, 1999; 1 1: 466-474.
- [16] Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 1996; 382 (6593): 722–5.
- [17] Liu R., Paxton W.A., Choe S., Ceradini D., Martin S.R., Horuk R., *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiplyexposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996; 86 (3): 367–77.
- [18] Dean M., Carrington M., Winkler C., Huttley G.A., Smith M.W., Allikmets R., *et al.* 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*. 1996; 273 (5283): 1856–62.
- [19] Hutter G., Nowak D., Mossner M., Ganepola S., Mussig A., Allers K., *et al.* Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *NEJM*. 2009; 360 (7): 692–8.
- [20] Gupta R.K., Abdul-Jawad S., McCoy L.E., Mok H.P., Peppas D., Salgado M., *et al.* HIV-1 remission following CCR5Delta32/Delta32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*. 2019; 568:244–8.
- [21] Bodor, J. Evidence for the Cure of HIV Infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 Stem Cell Transplantation. *Journal of Human Virology & Retrovirology*, 2014; 1 (2). <https://doi.org/10.15406/jhvr.2014.01.00008>
- [22] Gupta R.K., Peppas D., Hill A.L., Gálvez C., Salgado M., *et al.* Evidence for HIV-1 cure after CCR5 Δ 32/ Δ 32 allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report. *Lancet HIV*. 2020 May; 7 (5): e340-e347. doi: 10.1016/S2352-3018(20)30069-2.
- [23] Arendt, V., Amand, M., Iserentant, G., Lemaire, M., Masquelier, *et al.* (2019). Predominance of the heterozygous CCR5 delta-24 deletion in African individuals resistant to HIV infection might be related to a defect in CCR5 addressing at the cell surface. *Journal of the International AIDS Society*, 22(9). <https://doi.org/10.1002/jia2.25384>
- [24] Learmont J., Tindall B., Evans L. *et al.* Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet* 1992; 340: 863–867.
- [25] Zaunders J., Dyer W.B., and Churchill M. The Sydney Blood Bank Cohort: implications for viral fitness as a cause of elite control. *Curr. Opin. HIV AIDS* 2011; 6: 151-6.

- [26] Learnmont JC, Gezcy AF, Mills J *et al.* Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HI V-1. *N. Engl. J. Med.* 1999; 340: 1715–1722.
- [27] Migueles S.A., Sabbaghian M.S., Shupert WL *et al.* HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HI V-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 2709–2714.
- [28] Lambotte O., Boufassa F., Madec Y. *et al.* HIV controllers: a homogeneous group of HI V-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41: 1053–1056.
- [29] Kloosterboer N., Groeneveld P.H., Jansen C.A. *et al.* Natural controlled HI V infection: preserved HI V-specific immunity despite undetectable replication competent virus. *Virology* 2005; 339: 70–80.
- [30] Wang B., Dyer W.B., Zaunders J.J. *et al.* Comprehensive analyses of a unique HI V-1-infected nonprogressor reveal a complex association of immunobiological mechanisms in the context of replication-incompetent infection. *Virology* 2002; 304:246–264.
- [31] Dyer W.B., Zaunders J.J., Yuan F.F. *et al.* Mechanisms of HI V non-progression; robust and sustained CD4+ T-cell proliferative responses to p24 antigen correlate with control of viraemia and lack of disease progression after long-term transfusion-acquired HI V-1 infection. *Retrovirology* 2008; 5: 112.
- [32] Walker B.D., Yu X.G. Unravelling the mechanisms of durable control of HI V-1. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 487–498.
- [33] Ferre A.L., Hunt P.W., McConnell D.H. *et al.* HIV controllers with HLA -DRB1*13 and HLA -DQB1*06 alleles have strong, polyfunctional mucosal CD4+ T-cell responses. *J. Virol.* 2010; 84: 11020–11029.
- [34] Kestler, H. W.III, Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M.D., *et al.* Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 1991; 65; 651–662. doi.org/10.1016/0092-8674(91) 90097-I
- [35] Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., *et al.* Genomic structure of an attenuated quasi-species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* 1995; 270, 988–991. doi: 10.1126/science.270.5238.988
- [36] Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with non-progressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332, 228–232. doi: 10.1056/NEJM199501263320405

- [37] Salvi R., Garbuglia A.R., Di C.A., *et al.* Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J. Virol.* 1998; 72: 3646-57.
- [38] Hanna Z., Kay D.G., Rebai N., *et al.* Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 1998; 95: 163-75.
- [39] Gorry P.R., McPhee D.A., Verity E., *et al.* Pathogenicity and immunogenicity of attenuated, nef-deleted HIV-1 strains in vivo. *Retrovirology* 2007; 4: 66.
- [40] Baba T.W., Liska V., Khimani A.H., *et al.* Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat. Med.* 1999; 5: 194-203.
- [41] Geyer, M., Peterlin, M., Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef, *FEBS Letters*, 496, (2001), 91-95.
- [42] Lee, C. H., Saksela, K., Mirza, U. A., Chait, B. T., y Kuriyan, J.. Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell* 1996; 85, 931–942. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81276-3
- [43] Arold, S., Franken, P., Strub, M-P., Hoh, F., Benichou, S., Benarous, R., Dumas, C., The crystal structure of HIV-1 Nef protein bound to the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell signaling, *Structure* 5 (1997), 1361-1372.
- [44] Grzesiek, S. *et al.* (1996) The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* 35, 10256–10261
- [45] Grzesiek, S., Bax, A., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Hu, J. S., Kaufman, J., *et al.* The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase. *Nat. Struct. Biol.* 1996; 3, 340–345. doi: 10.1038/nsb0496-340
- [46] Grzesiek, S., Bax, A., Hu, J. S., Kaufman, J., Palmer, I., Stahl, S. J., *et al.* Refined solution structure and backbone dynamics of HIV-1 Nef. *Protein Sci.* 1996; 6, 1248–1263. doi: 10.1002/pro.5560060613
- [47] Arold, S. T., Baur, A.S., Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein, *TRENDS in Biochemical Sciences*, 26 (6), (2001), 356-363
- [48] Manninen, A. *et al.* SH3-domain binding function of HIV-1 Nef is required for association with a PAK-related kinase. *Virology* 1998; 250, 273–282
- [49] Xu, X. N. *et al.* Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J. Exp. Med.* 1999; 189, 1489–1496

- [50] Liu, L. X. *et al.* Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions. *J. Virol.* 2000; 74, 5310–5319
- [51] Arold, S. *et al.* Characterization and molecular basis of the oligomeric structure of HIV-1 Nef protein. *Protein Sci.* 2000; 6, 1137–1148
- [52] Matheson, N. J.; Sumner, J.; Wals, K.; Rapiteanu, R.; Weekes, M.P.; Vigan, R.; Weinelt, J.; Schindler, M.; Antrobus, R.; Costa, A.S.; *et al.* Cell Surface Proteomic Map of HIV Infection Reveals Antagonism of Aminoacid Metabolism by Vpu and Nef. *Cell Host Microbe* 2015, 18, 409–423.
- [53] Collins, K. L.; Chen, B. K.; Kalams, S.A.; Walker, B.D.; Baltimore, D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998, 391, 397–401.
- [54] Noviello, C. M.; Benichou, S.; Guatelli, J.C. Cooperative binding of the class I major histocompatibility complex cytoplasmic domain and human immunodeficiency virus type 1 Nef to the endosomal AP-1 complex via its mu subunit. *J. Virol.* 2008, 82, 1249–1258.
- [55] Piguet, V.; Gu, F.; Foti, M.; Demaurex, N.; Gruenberg, J.; Carpentier, J. L.; Trono, D. Nef-induced CD4 degradation: A diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell* 1999, 97, 63–73.
- [56] Schaefer, M. R.; Wonderlich, E. R.; Roeth, J. F.; Leonard, J. A.; Collins, K. L. HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells. *PLoS Pathog.* 2008, 4, e1000131.
- [57] Wildum, S.; Schindler, M.; Munch, J.; Kirchhoff, F. Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J. Virol.* 2006, 80, 8047–8059.
- [58] Stumptner-Cuvelette, P.; Morchoisne, S.; Dugast, M.; Le Gall, S.; Raposo, G.; Schwartz, O.; Benaroch, P. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 12144–12149.
- [59] Schindler, M.; Wurfl, S.; Benaroch, P.; Greenough, T.C.; Daniels, R.; Easterbrook, P.; Brenner, M.; Munch, J.; Kirchhoff, F. Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles. *J. Virol.* 2003, 77, 10548–10556.
- [60] Ghiglione, Y.; Rodriguez, A. M.; De Candia, C.; Carobene, M.; Benaroch, P.; Schindler, M.; Salomon, H.; Turk, G. HIV-mediated up-regulation of invariant chain (CD74) correlates with generalized immune activation in HIV+ subjects. *Virus Res.* 2012, 163, 380–384.

- [61] Chaudhry, A.; Verghese, D. A.; Das, S. R.; Jameel, S.; George, A.; Bal, V.; Mayor, S.; Rath, S. HIV-1 Nef promotes endocytosis of cell surface MHC class II molecules via a constitutive pathway. *J. Immunol.* 2009, 183, 2415–2424.
- [62] Cerboni, C.; Neri, F.; Casartelli, N.; Zingoni, A.; Cosman, D.; Rossi, P.; Santoni, A.; Doria, M. Human immunodeficiency virus 1 Nef protein downmodulates the ligands of the activating receptor NKG2D and inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Gen. Virol.* 2007, 88, 242–250.
- [63] Falco, M.; Marcenaro, E.; Romeo, E.; Bellora, F.; Marras, D.; Vely, F.; Ferracci, G.; Moretta, L.; Moretta, A.; Bottino, C. Homophilic interaction of NTBA, a member of the CD2 molecular family: Induction of cytotoxicity and cytokine release in human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 2004, 34, 1663–1672.
- [64] Shibuya, A.; Campbell, D.; Hannum, C.; Yssel, H.; Franz-Bacon, K.; McClanahan, T.; Kitamura, T.; Nicholl, J.; Sutherland, G.R.; Lanier, L.L.; Phillips, J.H. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 1996, 4, 573–581.
- [65] Matusali, G.; Potesta, M.; Santoni, A.; Cerboni, C.; Doria, M. The human immunodeficiency virus type 1 Nef and Vpu proteins downregulate the natural killer cell-activating ligand PVR. *J. Virol.* 2012, 86, 4496–4504.
- [66] Moll, M.; Andersson, S.K.; Smed-Sorensen, A.; Sandberg, J.K. Inhibition of lipid antigen presentation in dendritic cells by HIV-1 Vpu interference with CD1d recycling from endosomal compartments. *Blood* 2010, 116, 1876–1884.
- [67] Bachle, S. M.; Sauter, D.; Sibitz, S.; Sandberg, J.K.; Kirchhoff, F.; Moll, M. Involvement of a C-terminal motif in the interference of primate lentiviral Vpu proteins with CD1d-mediated antigen presentation. *Sci. Rep.* 2015, 5, 9675.
- [68] Cho, S.; Knox, K. S.; Kohli, L. M.; He, J. J.; Exley, M.A.; Wilson, S. B.; Brutkiewicz, R.R. Impaired cell surface expression of human CD1d by the formation of an HIV-1 Nef/CD1d complex. *Virology* 2005, 337, 242–252.
- [69] Chen, N.; McCarthy, C.; Drakesmith, H.; Li, D.; Cerundolo, V.; McMichael, A.J.; Sreaton, G.R.; Xu, X.N. HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef. *Eur. J. Immunol.* 2006, 36, 278–286.
- [70] Kasper, M. R.; Roeth, J.F.; Williams, M.; Filzen, T.M.; Fleis, R.I.; Collins, K.L. HIV-1 Nef disrupts antigen presentation early in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 12840–12848.
- [71] Hung, C. H.; Thomas, L.; Ruby, C. E.; Atkins, K. M.; Morris, N. P.; Knight, Z. A.; Scholz, I.; Barklis, E.; Weinberg, A. D.; Shokat, K.M.; *et al.* HIV-1 Nef assembles a Src family kinase-ZAP-70/Syk-PI3K cascade to downregulate cell-surface MHC-I. *Cell Host Microbe* 2007, 1, 121–133.

- [72] Atkins, K. M.; Thomas, L.; Youker, R. T.; Harriff, M. J.; Pissani, F.; You, H.; Thomas, G. HIV-1 Nef binds PACS-2 to assemble a multikinase cascade that triggers major histocompatibility complex class I (MHC-I) down-regulation: Analysis using short interfering RNA and knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 11772–11784.
- [73] Blagoveshchenskaya, A. D.; Thomas, L.; Feliciangeli, S. F.; Hung, C. H.; Thomas, G. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell* 2002, 111, 853–866.
- [74] Dikeakos, J. D.; Atkins, K. M.; Thomas, L.; Emert-Sedlak, L.; Byeon, I.J.; Jung, J.; Ahn, J.; Wortman, M.D.; Kukull, B.; Saito, M.; *et al.* Small molecule inhibition of HIV-1-induced MHC-I down-regulation identifies a temporally regulated switch in Nef action. *Mol. Biol. Cell* 2010, 21, 3279–3292.
- [75] Wonderlich, E. R.; Leonard, J. A.; Kulpa, D. A.; Leopold, K. E.; Norman, J. M.; Collins, K. L. ADP ribosylation factor 1 activity is required to recruit AP-1 to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail and disrupt MHC-I trafficking in HIV-1-infected primary T cells. *J. Virol.* 2011, 85, 12216–12226.
- [76] Yi, L.; Rosales, T.; Rose, J. J.; Chowdhury, B.; Knutson, J. R.; Venkatesan, S. HIV-1 Nef binds a subpopulation of MHC-I throughout its trafficking itinerary and down-regulates MHC-I by perturbing both anterograde and retrograde trafficking. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 30884–308905.
- [77] Sugden S.M., Bego M.G., Pham T.N., Cohen É. A. Remodeling of the Host Cell Plasma Membrane by HIV-1 Nef and Vpu: A Strategy to Ensure Viral Fitness and Persistence. *Viruses*. 2016 Mar 3;8(3):67. doi: 10.3390/v8030067.
- [78] Basmaciogullari, S., & Pizzato, M. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Frontiers In Microbiology*, 2004; 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00232
- [79] Munch, J., Rajan, D., Schindler, M., Specht, A., Rucker, E., Novembre, F. J., *et al.* Nef-mediated enhancement of virion infectivity and stimulation of viral replication are fundamental properties of primate lentiviruses. *J. Virol.* 2007; 81, 13852–13864. doi:10.1128/JVI.00904-07
- [80] Stevenson, M. Pathway to understanding AIDS. *Nat. Struct. Biol.* 1996; 3, 303–306. doi: 10.1038/nsb0496-303
- [81] Renkema, G. H., and Saksela, K. Interactions of HIV-1 NEF with cellular signal transducing proteins. *Front. Biosci.* 2000; 5: D268–D283
- [82] Carl, S., Greenough, T.C., Krumbiegel, M., Greenberg, M., Skowronski, J., Sullivan, J. L., *et al.* Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. *J. Virol.* 2001; 75, 3657–3665. doi: 10.1128/JVI.75.8.3657-3665.2001

- [83] Pizzato, M. MLV glycosylated-Gag is an infectivity factor that rescues Nef-deficient HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012; 107, 9364–9369.doi: 10.1073/pnas.1001554107
- [84] Aiken, C., and Trono, D. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J. Virol.* 1995; 69, 5048–5056.
- [85] Pandori, M. W., Fitch, N. J., Craig, H. M., Richman, D. D., Spina, C. A., y Guatelli, J. C. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J. Virol.* 1996; 70, 4283–4290.
- [86] Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H. R., y Krausslich, H. G. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* 1996; 219, 228–236.doi: 10.1006/viro.1996.0240
- [87] Bukovsky, A. A., Dorfman, T., Weimann, A., y Gottlinger, H. G. Nef association with human immunodeficiency virus type 1 virions and cleavage by the viral protease. *J. Virol.* 1997; 71, 1013–1018.
- [88] Laguette, N., Benichou, S., y Basmaciogullari, S. HIV-1 Nef Incorporation into Virions does not Increase Infectivity. *J. Virol.* 2009; 83, 1093–1104.doi:10.1128/JVI.01633-08
- [89] Qi, M., y Aiken, C. Nef enhances HIV-1 infectivity via association with the virus assembly complex. *Virology* 2008; 373, 287-297. Doi: 10.1016/j.virol.2007.12.001
- [90] Pizzato, M., Popova, E., y Gottlinger, H. G. Nef can enhance the infectivity of receptor-pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 2008; 82, 10811–10819.doi:10.1128/JVI.01150-08
- [91] Goldsmith, M. A., Warmerdam, M. T., Atchison, R. E., Miller, M. D., y Greene, W. C. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Virol.* 1995; 69, 4112–4121.
- [92] Miller, M. D., Warmerdam, M. T., Page, K. A., Feinberg, M. B., y Greene, W. C. Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry. *J. Virol.* 1995; 69, 579–584.
- [93] Tokunaga, K., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Akari, H., Koyama, A. H., *et al.* Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by Nef is producer cell-dependent. *J. Gen.Virol.* 1998; 79(Pt 10),2447–2453.
- [94] Khan, M., Garcia-Barrio, M., y Powell, M. D. Restoration of wild-type infectivity to human immunodeficiency virus type 1 strains lacking nef by intravirion reverse transcription. *J. Virol.* 2001; 75, 12081–12087.doi:10.1128/JVI.75.24.12081-12087.2001
- [95] Tobiume, M., Takahoko, M., Tatsumi, M., y Matsuda, M. Establishment of a MAGI-derived indicator cell line that detects the Nef enhancement of HIV-1 infectivity with

- high sensitivity. *J. Virol. Methods* 2001; 97, 151–158.doi:10.1016/S0166-0934(01)00349-4
- [96] Papkalla, A., Munch, J., Otto, C., y Kirchhoff, F. Nef enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity and replication independently of viral coreceptor tropism. *J. Virol.* 2002; 76, 8455–8459.doi:10.1128/JVI.76.16.8455-8459.2002
- [97] Chowers, M. Y., Spina, C. A., Kwok, T. J., Fitch, N. J., Richman, D. D., y Guatelli, J. C. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J. Virol.* 1994; 68, 2906–2914.
- [98] Schwartz, O., Marechal, V., Danos, O., and Heard, J.M. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J. Virol.* 1995; 69, 4053–4059.
- [99] Campbell, E. M., Nunez, R., y Hope, T. J. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J. Virol.* 2004; 78, 5745–5755.doi:10.1128/JVI.78.11.5745-5755.2004
- [100] Khan, M., García-Barrio, M., y Powell, M.D. Restoration of wildtype infectivity to human immunodeficiency virus type 1 strains lacking nef by intravirion reverse transcription. *J. Virol.* 2001; 75, 12081–12087.doi: 10.1128/JVI.75.24.12081-12087.2001
- [101] Hulme, A. E., Perez, O., y Hope, T. J. Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108, 9975–9980.doi:10.1073/pnas.1014522108
- [102] Yang, Y., Fricke, T., y Díaz-Griffero, F. Inhibition of reverse transcriptase activity increases stability of the HIV-1 core. *J. Virol.* 2013; 87, 683–687.doi: 10.1128/JVI.01228-12
- [103] Forshey, B. M., y Aiken, C. Disassembly of human immunodeficiency virus type 1 cores in vitro reveals association of Nef with the subviral ribonucleoprotein complex. *J. Virol.* 2003; 77, 4409–4414.doi:10.1128/JVI.77.7.4409-4414.2003
- [104] Brugger, B., Krautkramer, E., Tibroni, N., Munte, C.E., Rauch, S., Leibrecht, I., *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein modulates the lipid composition of virions and host cell membrane microdomains. *Retrovirology* 2007; 4:70. doi:10.1186/1742-4690-4-70
- [105] Bregnard, C., Zamborlini, A., Leduc, M., Chafey, P., Camoin, L., Saib, A., *et al.* Comparative proteomic analysis of HIV-1 particles reveals a role for Ezrin and EHD4 in the Nef-dependent increase of virus infectivity. *J. Virol.* 2012; 87, 3729–3740. doi:10.1128/JVI.02477-12

- [106] Pizzato, M., Helander, A., Popova, E., Calistri, A., Zamborlini, A., Palu, G., *et al.* Dynamitin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104, 6812–6817. doi:10.1073/pnas.0607622104
- [107] Cosma A., Nagaraj R., Bühler S., Hinkula J., Busch D. H., Sutter G., Goebel F. D., Erfle V. Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. *Vaccine*. 2003 Dec 8;22(1):21-9. doi: 10.1016/s0264-410x(03)00538-3.
- [108] Borrow P., Lewicki H., Hahn B. H., Shaw G. M., Oldstone M. B. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994; 68 (9): 6103–10.
- [109] Koup R. A., Safrit J. T., Cao Y., Andrews C. A., McLeod G., Borkowsky W., *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994; 68:4650–4655.
- [110] Borrow P, Lewicki H, Wei X, *et al.* Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997;3(2):205–11.
- [111] Goulder P. J., Phillips R. E., Colbert R. A., *et al.* Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* 1997; 3 (2): 212–7.
- [112] Pitcher C. J., Quittner C., Peterson D. M., *et al.* HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection but decline with prolonged viral suppression. *Nat. Med.* 1999; 5 (5): 518–25.
- [113] Rosenberg E. S., Billingsley J. M., Caliendo A. M., *et al.* Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997; 278 (5342): 1447–50.
- [114] Rosenberg E. S., Altfeld M., Poon S. H., *et al.* Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000; 407 (6803): 523–6.
- [115] Davoodi S., Bolhassani A., Namazi F. In vivo delivery of a multiepitope peptide and Nef protein using novel cell-penetrating peptides for development of HIV-1 vaccine candidate. *Biotechnol Lett.* 2021 Mar; 43 (3): 547-559. doi: 10.1007/s10529-020-03060-3.
- [116] Wilson J. D., Ogg G. S., Allen R. L., Davis C., Shaunak S., Downie J., *et al.* Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *AIDS* 2000; 14:225–233.
- [117] Schmitz J. E., Kuroda M. J., Santra S., Sasseville V. G., Simon M. A., Lifton M. A., *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8R lymphocytes. *Science* 1999; 283:857– 860.2456 AIDS 2016, Vol 30 No 16

- [118] Hansen S. G., Piatak M. Jr, Ventura A. B., Hughes C. M., Gilbride R. M., Ford J. C., *et al.* Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature* 2013; 502:100–104.
- [119] Hansen S. G., Sacha J. B, Hughes C. M, Ford J. C, Burwitz B. J, Scholz I., *et al.* Cytomegalovirus vectors violate CD8R T cell epitope recognition paradigms. *Science* 2013; 340:1237874.
- [120] Buchbinder S. P., Mehrotra D. V., Duerr A., Fitzgerald D. W., Mogg R., Li D., Gilbert P. B., Lama J. R., Marmor M., Del Rio C., McElrath M. J., Casimiro D. R., Gottesdiener K. M., Chodakewitz J. A., Corey L., Robertson M. N.; Step Study Protocol Team. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet*. 2008 nov 29; 372 (9653): 1881-1893. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61591-3.
- [121] McElrath M. J., De Rosa S. C., Moodie Z., Dubey S., Kierstead L., Janes H., *et al.* HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet*. 2008 Nov 29; 372 (9653): 1894-1905. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61592-5.
- [122] Rolland M., Tovanabutra S., de Camp A. C., Frahm N., Gilbert P. B., Sanders-Buell E., *et al.* Genetic impact of vaccination on breakthrough HIV-1 sequences from the STEP trial. *Nat. Med.* 2011; 17:366–371.
- [123] Park S. Y., Love T. M., Perelson A. S., Mack W. J., Lee H. Y. Molecular clock of HIV-1 envelope genes under early immune selection. *Retrovirology* 2016; 13:38.
- [124] Kang, C. Y., y Gao, Y. Killed whole-HIV vaccine, employing a well-established strategy for antiviral vaccines. *AIDS Research and Therapy*, 20017; 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0176-5>
- [125] Daniel, M. D., F. Kirchhoff, S. C. Czajak, P. K. Sehgal, and R. C. Desrosiers. 1992. Protective effects of a live-attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258: 1938–1941.
- [126] Wyand, M. S., K. H. Manson, M. Garcia-Moll, D. Montefiori, and R. C. Desrosiers. 1996. Vaccine protection by a triple deletion mutant of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 70: 3724–3733.
- [127] Dekaban, G. A., & Dikeakos, J. D. HIV-I Nef inhibitors: a novel class of HIV-specific immune adjuvants in support of a cure. *AIDS Research and Therapy*, 2017; 14 (1). <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0175-6>.
- [128] Gabriel B., Fiebig U., Hohn O., Plesker R., Coulibaly C., Cichutek K., Mühlebach M. D., Bannert N., Kurth R., Norley S. Suppressing active replication of a live attenuated simian immunodeficiency virus vaccine does not abrogate protection from challenge. *Virology*. 2016 Feb; 489:1-11. doi: 10.1016/j.virol.2015.11.030.

- [129] Almond, N., K. Kent, M. Cranage, E. Rud, B. Clarke, and E. J. Stott. Protection by attenuated simian immunodeficiency virus in macaques against challenge with virus-infected cells. *Lancet* 1995; 345:1342–1344.
- [130] Blower S. M., Koelle K., Kirschner D. E., Mills J. Live attenuated HIV vaccines: predicting the tradeoff between efficacy and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001 Mar 13; 98 (6): 3618-23. doi: 10.1073/pnas.061029998.
- [131] Desrosiers R. C. Will there be a live-attenuated HIV vaccine available for human safety trials by the year 2000? Interview by Gordon Nary. *J. Int. Assoc. Physicians. AIDS Care.* 1998 Nov; 4 (11):22-3. PMID: 11366120
- [132] Johnson R. P. Live attenuated AIDS vaccines: hazards and hopes. *Nat Med.* 1999 Feb; 5 (2): 154-5. doi: 10.1038/5515.
- [133] Mills J., Desrosiers R., Rud E., Almond N. Live attenuated HIV vaccines: a proposal for further research and development. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2000 Oct 10; 16 (15): 1453-61. doi: 10.1089/088922200750005976.
- [134] Murphey-Corb M. Live-attenuated HIV vaccines: how safe is safe enough? *Nat. Med.* 1997 Jan; 3 (1): 17-8. doi: 10.1038/nm0197-17.
- [135] Mu Z., Haynes B. F., Cain D. W. HIV mRNA Vaccines-Progress and Future Paths. *Vaccines (Basel).* 2021 Feb 7; 9 (2): 134. doi: 10.3390/vaccines9020134.