



Kandidaatintutkielma

Modernien hoitomenetelmien toimintamekanismit
HIV-tyypin 1 hoidossa

Jani Åman

Oulun yliopisto

Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta

2018

Sisällysluettelo

1. Ihmisen immuunijärjestelmä	4
1.1 HIV maailmanlaajuisena epidemiana.....	4
1.2 HIV tartunta.....	5
2. Human Immunodeficiency virus	6
2.1 Viruksen rakenne.....	6
2.2 Viruksen toiminta.....	9
2.2.1 Viruksen replikaatio ja lisääntyminen.....	9
2.3 Kehitetyt lääkehoidot ja toimintamekanismit.....	10
2.3.1 Lääkehoidon historia.....	10
2.3.2 Nykyajalla käytetty yhdistelmäterapia HAART.....	11
2.3.3 NRTI ja NNRTI.....	12
2.3.4 Proteaasi-inhibiittorit.....	13
2.3.5 Integraasi-inhibiittorit.....	14
3. Kantasoluterapia HIV:n hoidossa	15
3.1 CTL.....	16
3.2 CAR-T/CAR-NK ja luonnolliset tappajasolut.....	17
3.3 NK-solut ja HIV.....	18
3.4 CRISPR-Cas9.....	19
4. Lopuksi	21
5. Kirjallisuus	22

Lyhennelistaus:

HIV	Human immunodeficiency virus
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
CAR	Chimeric antigen receptor
CAR-T	Chimeric antigen receptor modified T-cell
NK	Natural killer
CAR-NK	Chimeric antigen receptor modified natural killer
CRISPR	Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeat
Cas9	CRISPR associated protein 9
NRTI	Nucleoside reverse transcriptase inhibitor
NNRTI	Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor
HAART	Highly active anti-retroviral therapy
gRNA	Guide ribonucleic acid, guideRNA
ssDNA	Single stranded deoxyribonucleic acid
dsDNA	Double stranded deoxyribonucleic acid
TCR	T-cell receptor
cART	Combination antiretroviral therapy

1. Ihmisen immuunijärjestelmä

Immuunijärjestelmä on monimutkainen kokonaisuus, jonka yksinkertainen tavoite on pitää meidät terveenä. Tähän järjestelmään liittyy useita elimiä ja niiden muodostamia vuorovaikutussuhteita, jossa erilaiset hormonit ja solut toimivat koordinoitusti yhdessä pitäen elimistön patogeenejä loitolla. Meillä jokaisella on luonnostaan niin sanottu synnynnäinen immunitetti, joka kehittyy jo sikiöaikana. Tämä immunitetti ei toimi yksin. Lisäksi ympäristön vaikutuksesta johtuen voidaankin puhua myös hankitusta immuunipuolustuksesta. Tähän liittyy muun muassa elimistön muistisolujen kyky adaptoida uusiin taudinaiheuttajiin, joihin pystytään tulevaisuudessa reagoimaan entistä nopeammin (Lumio 2018a)

Immuunijärjestelmä voidaan jakaa hankittuun ja luonnolliseen immunitettiin. Luonnollisella immunitetilla tarkoitetaan soluja, jotka ovat kehittyneet ihmisen sikiöaikana. Nämä luonnolliset immunitetin solut eivät tarvitse aiempaa kosketusta patogeeniin, toisin kuin hankitun immunitetin solut. Hankitulla immunitetilla tarkoitetaan jo aiemmin patogeeniin reagoivaa solua, josta jää ikään kuin muistijälki. Tällaisia soluja ovat muun muassa B- ja T-solut. Rokotukset perustuvat myös näiden solujen toimintaan, sillä T-soluihin kuuluvat muistisolut toimivat tärkeässä asemassa. (Lumio. 2018, Zhao *et al.* 2012)

1.1 HIV maailmanlaajuisena epidemiana

Ihmisen immuunijärjestelmän ylläpitävien solujen infektoiva ihmisen immunikatovirus (Human Immunodeficiency virus) on aiheuttanut globaalisti suuria terveydellisiä ongelmia varsinkin viime vuosikymmeninä. HI-virus tunnetaan parhaiten AIDS:n (acquired immune deficiency syndrome, suomeksi hankittu immuunivajesyndrooma) aiheuttajana. (Kumar *et al.* 1997). AIDS on HIV infektion aiheuttama tauti, jossa ihmisen immuunijärjestelmää ylläpitävien T-solujen määrä on laskenut huomattavasti ja henkilö on näin alttiimpi muille oheissairauksille, jotka normaali immuunijärjestelmä pystyisi eliminoimaan. Mikäli CD4⁺-solujen määrä laskee alle 200 solua/mm³, puhutaan jo kuolemanvakavasta tilasta (Ford *et al.* 2017). 350 solua/mm³ on nykyisin raja, jolloin lääkehoito tulisi aloittaa (Sabin & Phillips 2009).

HI-viruksen lääkehoito on nykyään mahdollinen, mutta se vaatii jatkuvaa lääkitystä ja tämä on ollut maailmanlaajuinen ongelma varsinkin ihmisille kehitysmaissa, jossa terveydenhuollon puute ja lääkkeiden suuri kustannus on aiheuttanut suuria epidemiapurkauksia viime vuosikymmeninä. HIV

kuuluu nykymaailmassa joukkoon virusepidemioista, jolle ei ole kehitetty täysin toimivaa lääkehoitoa, mutta HIV-tapausten kasvaessa viime vuosikymmeninä on myös lääkehoidot kehittyneet nopeasti samassa tahdissa (CDC, 2018) HI-viruksen kanssa arvioidaan elävän 39 miljoonaa ihmistä, joista kuitenkin 59%:lla oli vuonna 2017 mahdollisuus ART-hoitoihin (WHO 2018).

1.2 HIV-tartunta

HI-virus on kohtuullisen vaikeasti tarttuva ja se vaatii suoran limakalvokontaktin veren, siemennesteen, äidinmaidon tai vaginallisten eritteiden kanssa. HI-viruksen kohdesoluina toimivat CD4⁺ T-solut, joiden rooli ihmisen immuunijärjestelmän ylläpidossa on vitaali. Tarkemmin sanottuna T-lymfosyyttien pintaproteiinien CCR5- ja CXCR4 reseptorit, joihin HI-viruksen pintaproteiineihin kuuluvat rakenteet sitoutuvat, ovat avainasemassa virustartunnan alkuvaiheessa. CD4⁺ soluista varsinkin tyyppien CD45RA⁻ CD27⁺ ja CD69⁺ -muistisolut toimivat HI-viruksen kohdesoluina (Kivisakk *et al.* 2002). Infektio johtaa lopulta muistisolujen toiminnan heikkenemiseen ja näin ollen epäsuorasti heikentää ihmisen immuunivastetta, aiheuttaen suuremman todennäköisyyden altistua eri taudinaiheuttajille (Joseph *et al.* 2015).

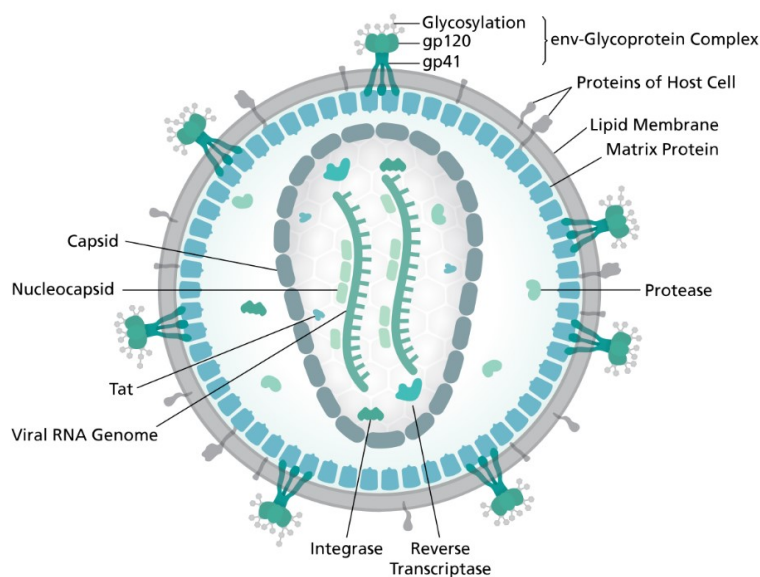
Reseptorin ja koreseptorin sitoutuessa T-solu ja HI-virus aloittavat fuusion, jossa virus endosytoituu lymfosyytiin sisään ja viruksen membraani fuusioituu endosomaalisen membraanin kanssa endosomaalisessa kalvostossa (Uchil & Mothes 2009). Samalla tämä prosessi vapauttaa viraalisen RNA:n ja kolme replikaatioentsyymiä, jotka toimivat uuden viruksen rakenneaineena (Joseph *et al.* 2015).

2. Human immunodeficiency virus eli HIV

2.1 Viruksen rakenne

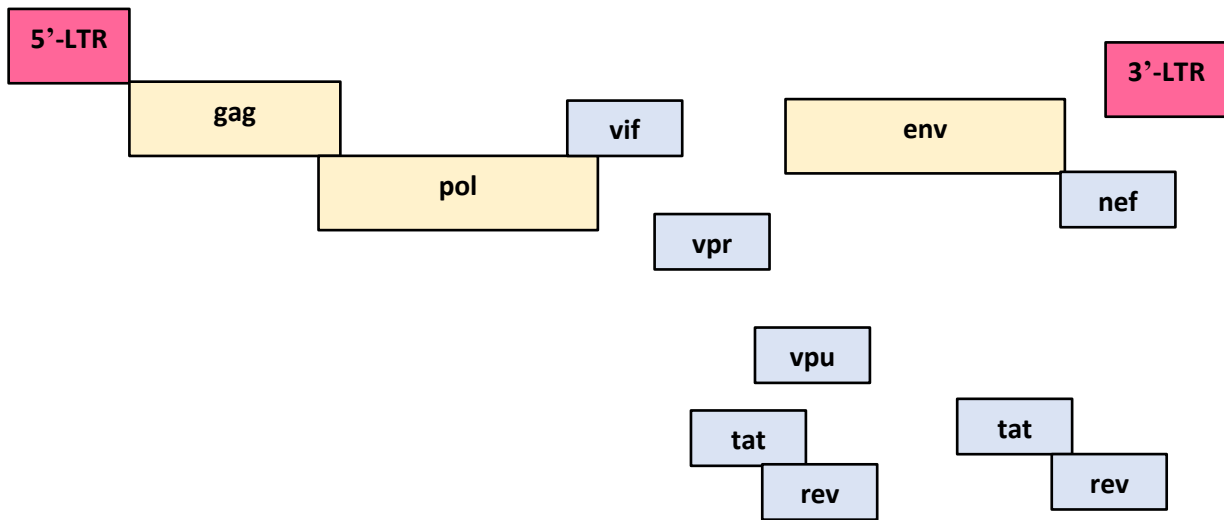
Virus luokitellaan kahteen eri tyyppiin perustuen niiden erilaisiin evoluutiohaaroihin. HIV-1 tyyppiin virus on yleisempi ja sen genomi johtaa Keski-Afrikan simpanssilajeilta. Ihmisellä harvinaisempi HIV-2 -tyyppi juontaa taas Länsi-Afrikan Mangabey-lajin apinoilta. HI-virus on ihmisten keskuudessa itsessään melko uusi, sillä sen olemassaolo ihmisellä huomattiin vasta 1900-luvun puolivälissä (Reiner *et al.* 2016).

HI-virus on retroviruksiin (Retroviridae) kuuluva, yksijuosteisen RNA-genomin omaava (pallomainen) lentivirus, jota ympäröi vaippamainen kuori ja lipidimembraani (Lumio 2018b). Itse membraaniin on ankkuroituneena erilaisia vaippaproteiineja, kuten gp120 ja gp4 (Reiner *et al.* 2016).



Kuva 1. HI-viruksen rakenne ja koostumus (Karki 2017). Viruspartikkelin pinnalta löytyy membraani, joka on muodostunut isäntäsolun fuusion aikana. HI-viruksen pinnalla olevat gp120 (ankkuriproteiini) ja gp41(transmembraani) pintaproteiinit sijaitsevat membraanin pinnalla. Kuorimainen vaippa koostuu lipidikerroksesta ja membraaniproteiineista kuten (gp120) ja (gp41) -reseptorityypeistä. Membraanin sisällä sijaitsee viruksen toiminnallisen yksikön sisältämä kapseli. Tämä kapseli sisältää 3 entsyymiä: käänteiskopioijaentsyymiin, proteaasiin ja integraasiin. Lisäksi kapseli sisältää kaksi RNA genomia (Reiner *et al.* 2016).

0 _____ 9 kb



Kuva 2. HIV-1 -tyypin genomirakenne, josta nähdään viruksen rakentuminen. Rakenne koostuu 5'-pään toistojaksosta, spesifisestä antigeeniryhmästä (gag), polymeraasijaksosta, ja vaippaproteiinien geneistä (env). Genomirakenteeseen kuuluu myös säätelygeenit. (Reiner *et al.* 2016) Näiden säätelijöiden ansiosta sopeutuu vaikeaan, uuteen ympäristöön mm. säätelemällä viruksen lisääntymistä ja infektointikykyä (nef) tai esimerkiksi estää sitä vastaan toimivia inhibiittoreita (vif) (Malim & Emerman 2008). Tarkempi kuvaus löytyy seuraavan sivun taulukosta.

Taulukko 1. HI-viruksen keskeisimmät rakenneosat ja niiden funktiot. Lisäksi taulukosta ilmenee viruksen eri säätelijäproteiinit ja niiden tehtävä (Reiner *et al.* 2016, Malim & Emerman 2008).

Rakenneosa	Toiminto
RNA	Sisältää viruksen genomin, joka kattaa koko viruksen elinkaareen tarvittavan geneettisen tiedon uusien viruksien transkriptioon. Toimii templaattina yksijuosteiselle DNA:lle.
ssDNA (Single stranded DNA)	Viruksen RNA:n esimuoto, toimii templaattina kaksijuosteiselle DNA:lle.
dsDNA (Double stranded DNA)	Viruksen integroitunut muoto, joka voidaan liittää isäntäsolun tuman genomiin.
Vif (viral infectivity protein)	Mahdollistaa <i>in vivo</i> viruksen infektointikyvyn haittaamalla tapahtumaa häiritseviä inhibiittoreita.
Vpu (virus protein unique)	Kontrolloi CD4 reseptorien hajoamista ja solunsisäistä liikennettä. Huolehtii myös infektoivien virusten pääsystä solusta ulos.
Nef (negative regulating factor)	Vaikuttaa HIV:n replikaatioon. Parantaa viruspartikkelien infektointikykyä mm. nopeuttamalla CD4-solujen endosytoosia infektoituneiden solujen pinnalla.
Rev (RNA splicing regulator)	Säätlee ei-silmukoitujen lähetti-RNA:iden solusta poispääsyä ja osittain myös silmukoitujen.
Tat (transactivator protein)	Aktivoi virusgeenien transkriptiota
Gag (protein complex)	Sisältää rakenteelliset toistojaksot. Viruskapsidin, matriksiproteiinin ja nukleoproteiinin toistojaksot.
Pol (protein complex)	Toistojakso, joka sisältää käänteiskopioijaentsyymien, proteaasin ja integraasin toistojaksot
Vpr (Virus protein r)	Viruspartikkelin komponentti. Edesauttaa viruksen tartuntakykyä ja vaikuttaa solusykliin.

2.2 Viruksen toiminta

Yleisesti, kun kyse on normaalista flunssasta, on niiden aiheuttajana usein esimerkiksi Rhinovirus (Laurie *et al.* 2015). Muun muassa vuotuiset influenssat johtuvat erityyppisistä viruskannoista, jotka ovat päässeet elimistöön ja ovat alkaneet lisääntyä isäntäsolujen sisällä. Nämä mutatoituvat virukset eivät muuta isäntäsolun perimää, vaan loisivat kohdesolussa, aiheuttaen haittaa sen kasvulle ja aiheuttaen lyyttisen syklin ja lopulta isäntäsolukuoleman. Esimerkiksi jokavuotinen influenssavirus mutatoituu helposti ja näin ollen uusi kanta pääsee helposti tartuttamaan, mikäli rokotetta ei ole saatu (Taubenberger & Morens 2008).

Kuten kaikki retrovirukset, myös HI-virus tunnistaa spesifiset reseptorit ja se liitetään isäntäsolun DNA:han. Viruspartikkelin fuusioituessa soluun, vapauttaa se oman genominsa, joka toimii semmoisenaan lähetti-RNA:na, mutta joka sitten käänteiskopioidaan kaksoisjuosteiseksi DNA:ksi, joka liitetään osaksi isäntäsolun DNA:ta. Tämä johtaa isäntäsolun normaalin toiminnan häiriöön ja solu alkaa tuottamaan proteiinisynteesin kautta viruksen proteiineja, jotka kootaan lopulta valmiiksi viruspartikkeliksi (Hayward 2017).

2.2.1 Viruksen replikaatio ja lisääntyminen

Infektiivisen HI-viruksen rakenteeseen sisältyy kaksi identtistä kopiota yksijuosteista RNA -genomia, käänteiskopioijaentsyymejä (reverse transcriptase), intergraaseja (integrase) ja proteaaseja (protease). Jokainen entsyymeistä toimii viruksen toiminnan kannalta korvaamattomassa roolissa. Kaikki viruspartikkelit vapautuvat kohdesolun sytoplasmaan viruksen solukalvon fuusioituessa soluun ja viruksen toiminta alkaa sillä, että kaksi RNA juostetta ohjataan käänteiskopioijaentsyymille, joka ensin kääntää RNA-juosteen yksijuosteiseksi DNA-juosteeksi. Tämä DNA jakso jälleen muutetaan kaksijuosteiseksi DNA:ksi, joka on valmis siirrettäväksi ja liitettäväksi solun DNA:han. Liittämiseen tarvitaan integraasia, joka kykenee viemään viraalisen DNA:n solun tumaan ja liittämään sen solun DNA-juosteeseen. Solun toiminta jatkuu normaalisti, mutta omien geenituotteidensa lisäksi solut tuottavat myös lähetti-RNA:ta, joka koodaa viruksen

geenejä. Syntyvä virusproteiiniketju pilkotaan osiin proteaasientsyymien avulla ja tämä prosessi on uusien viruksien kannalta erittäin tärkeä vaihe. Uudet partikkelit kootaan uusiksi viruksiksi, jotka kypsyessään infektoivat uusia soluja (Kumar *et al.* 1997).

2.3 Kehitetyt lääkehoidot ja toimintamekanismit

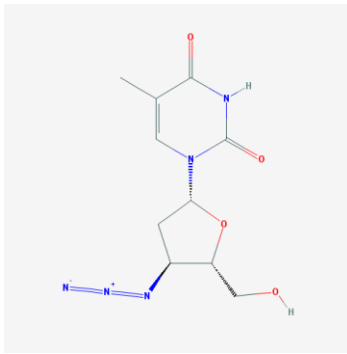
Vaikka HI-virus on epidemiana suhteellisen uusi, on se globalisaation seurauksena kehittynyt maailmanlaajuisesti ongelmaksi. Viime vuosikymmeninä viruksen lääkehoitoon on panostettu entistä enemmän, ja lääkkeiden teho onkin kehittynyt huomattavasti parantaen HIV-positiivisten ihmisten elämänlaatua (Clercq 2007). Suurista menestyksellisistä läpimurroista huolimatta viruksen täysi poisto elimistöstä on osoittautunut vaikeaksi prosessiksi, vaatiessaan potilaille kroonisen sairauden tapaan jatkuvaa lääkitystä koko loppuelämäkseen (CDC 2018).

Mikä tekee juuri tästä viruksesta sitten niin erikoisen, ettei elimistö pysty sitä eliminoimaan? HI-virus on lentivirus, joka iskee CD⁴ -auttaja-T-muistisoluihin. Näiden solujen pääasiainen tehtävä on mm. reagoida, kun vanha, ennestään tuttu taudinaiheuttaja on päässyt elimistöön ja aktivoitua adaptiivinen immuunivaste. Rokotteiden avulla muistisoluja voidaan altistaa heikennetyille taudinaiheuttajalle, jolloin syntyvä muistijälki edesauttaa muistisolujen toiminnasta aiheutuvaa valkosolujen lisääntymistä, kun itse vaarallinen taudinaiheuttaja pääsee elimistöön. Pieni altistaminen patogeenille auttaa jopa vuosikymmenten jälkeen elimistön valkosoluja jakautumaan nopeammin. HI-viruksen infektoidessa näitä muistisoluja, voi viruksen perimä jäädä passiivisen muistisolun perimään ja jäädä sinne inaktiiviseen muotoon. Jakautuessaan myös genomiin liitetty virus jakautuu samalla. Juurikin tämä muistisolujen perimässä piilottelu tekee HI-viruksesta erittäin vaikean tapauksen, sillä virus elää inaktiivisessa muodossa muistisolujen perimässä ja pystyy käynnistämään uusien viruksien replikaation useita vuosia infektion jälkeen (Marsden & Zack 2015).

2.3.1 Lääkehoidon historia

Ensimmäisen kerran HI-virus raportoitiin ihmisellä 1980-luvun alussa, jolloin taudin todettiin myös aiheuttavan immuunikatoa. Tauti saikin nopeasti stigman, jonka mukaan virus leviää ainoastaan homoseksuaalien keskuudessa, mikä kuitenkin todettiin vääräksi vain pari vuotta sen jälkeen, kun ensimmäinen raportoitu virus ilmeni (Cloete *et al.* 2008). Kuitenkin kyseinen stigma ilmenee vielä nykypäivänäkin mm. Punaisen ristin toiminnassa Suomessa, missä homoseksuaalit eivät saa luovuttaa verta HI-viruksen mahdollisuuden vuoksi.

Ensimmäinen HI-virukseen kehitetty lääke lanseerattiin vuonna 1987. (Lumio. 2018) Kyseessä oli atsidotymidiini (jatkossa Zidovudine tai AZT), joka on tymidiinianalogin kaltainen, käänteiskopioijaentsyymiä inhiboiva lääkeaine (Scruggs & Dirks Naylor. 2008). Lääke osoittautui aluksi erittäin tehokkaasti, mutta käänteiskopioijaentsyymin mutatoituminen aiheutti lääkkeen tehon nopean alenemisen (Boyer *et al.* 2015)



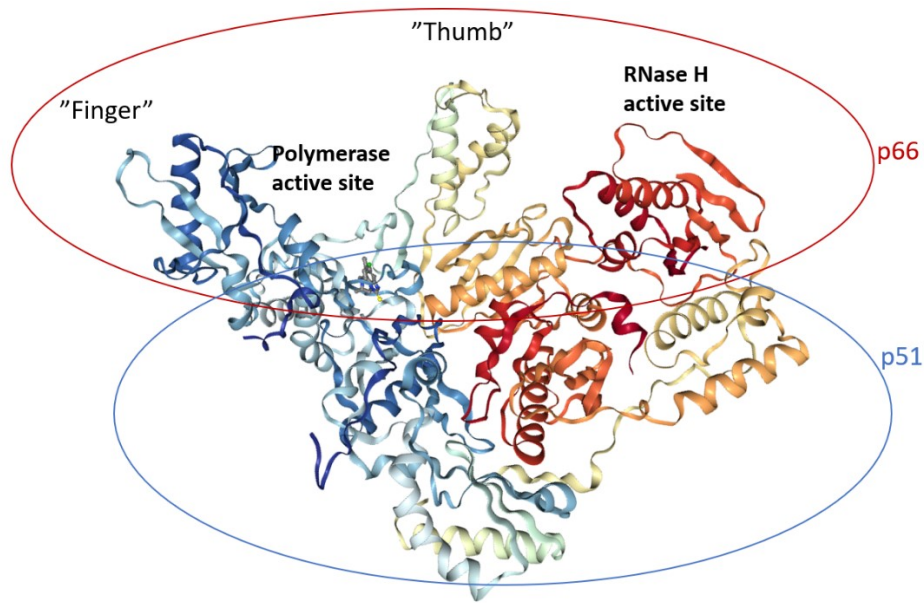
Kuva 3. AZT:n rakennekaava
(Kim S *et al.* 2018. Pubchem)

2.3.2 Nykyajalla käytetty yhdistelmäterapia

Seuraava läpimurto lääkekehityksessä saavutettiin vuonna 1996, jolloin kolmen vaikuttavan aineen kehittämä ns. HAART -menetelmä (Highly active antiretroviral therapy) otettiin käyttöön (Lumio. 2018) Kyseinen menetelmä HI-viruksen leviämisen hoidossa on säilynyt nykypäiväänkin saakka. HAART-menetelmä perustuu HI-viruksen toiminnan inhibointiin sen jokaisessa elämänvaiheessa. Lääkkeillä voidaan estää viruksen fuusiota kohdesoluun ja inhiboida viruksen tunnistamiskykyyn vaikuttavia CCR5 -reseptoreja. Tämän lisäksi HI-viruksen omien entsyymien toimintaa ja aktiivisuutta voidaan häiritä merkittävästi. Yhdistelmäterapiaa voidaankin pitää niin sanottuna lääkecocktailina, jossa potilaalle etsitään parhaat toimivat lääkeinhibiittorit, jotka yleensä inhiboivat viruksen omien entsyymien toimintakykyä estämällä niiden konformaatiomuutoksen. Nämä lääkkeet yleensä matkivat entsyymeille luonnollisia molekyyliä, jotka esiintyvät HI-viruksella. Lääkemolekyylit siis sitoutuvat samalla tavalla kuten HIV:n luonnolliset rakennemolekyylit, mutta samalla estää sen toiminnan estäen muun muassa post-translatiivisen muokkauksen. Terapian toimimista mitataan potilastyössä säännöllisillä CD4⁺-solujen lukumäärän määrittämisellä (Arts & Hazuda 2012).

2.3.3 NRTI ja NNRTI

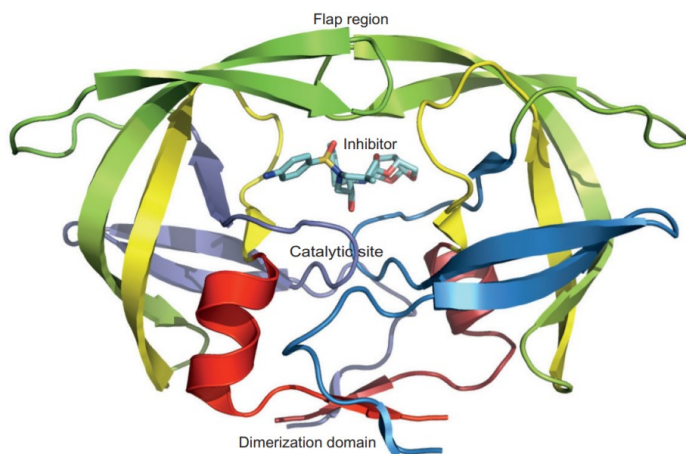
Jo aiemmin lääkehoidossa käytetyt nucleoside reverse transcriptase -inhibiittorit (NRTI) antoivat suunnan käänteiskopioijaentsyymien toiminnan inhiboimisessa, mutta entsyymien korkean muuntautumiskyvyn vuoksi, lääke ei osoittautunut tarpeeksi tehokkaaksi yksin. AZT on yksi esimerkki kyseisten tyyppisestä lääkkeestä (Boyer *et al.* 2015). Kyseisten lääkeaineiden vaikutus on ollut elimistölle myös myrkyllistä, varsinkin mitokondriolle, ja on aiheuttanut muita sivuvaikutuksia potilaissa mm. pahoinvointia ja vatsakipuja. Myrkyllisimpiä markkinoilla olleita lääkevalmisteita ovat olleet Didanosine, Stavudine ja Zalcitabine. Myös aiemmin mainittu Zalcitabine eli AZT oli havaittu aiheuttavan sivuvaikutuksia potilaille (Margolis *et al.* 2014) Non-nucleoside reverse transcriptase inhibiittorit (NNRTI) toimivat myös käänteiskopioijaentsyymiä inhiboivasti. NNRTI:n vaikutusten on huomattu omaavan vähemmän terveyshaittoja kuin NRTI:t, ja sen vaikutusmekanismi perustuu siihen, että se sitoutuu RT:n hydrofobiseen taskun aktiiviseen kohtaan. Tämä konformaatiomuutos estää uusien nukleotidien liittämisen syntyvään virus-DNA:han. Kaupallisiin NNRTI:hin kuuluu esimerkiksi Nevirapine, Etravirine ja Delavirdine (Margolis *et al.* 2014, Steven J Smith *et al.* 2016).



Kuva 4. (PDB) Rakennekuva käänteiskopioijaentsyymistä ja sen kahdesta aktiivisesta keskuksesta (polymerase active site ja RNase H active site), joihin sekä NTRI:t ja NNRTI:t vaikuttavat inhiboivasti. Entsyymi on kahdesta alayksiköstä (p66 ja p51) koostuva dimeeri jonka tehtävänä on käänteiskopioida viruksen genomien RNA ensin yksijuosteiseksi DNA:ksi käyttäen solun vapaita nukleotidejä ja jälleen muuntaa yksijuosteinen DNA kaksijuosteiseksi. NRTI ja NNRTI:n tehtävä on sitoutua yllämainittuihin aktiivisiin kohtiin ja estää entsyymin toiminnan kannalta välttämätön konformaatiomuutos (Steven J Smith *et al.* 2016).

2.3.4 Proteaasi-inhibiittorit

Proteaasin pääasiallinen tehtävä on toteuttaa post-translacionaalista muokkausta syntyneelle viraaliselle lähetti-RNA:lle. Kyseisen entsyymin tehtävä korostuu, kun viruspartikkelien gag ja gag-pro-pol osat erotetaan toisistaan prosessin aikana ja ne kehittyvät omiksi proteiineiksi (Akbar Ali *et al.* 2010). Proteaasi on homodimeerinen proteiinikompleksi, jonka tehtävänä on siis ”leikata” syntyvän gag ja pol polyproteiinint yksittäisiksi proteiineiksi. Kyseinen tapahtumaketju on uusien viruksien synteesin kannalta välttämätön ja juuri siksi kyseinen entsyymi onkin ollut toinen pääasiallinen kohde lääkevalmisteisille entsyymeille. (Lv *et al.* 2015, Akbar Ali *et al.* 2010) Yleisiä proteaasia inhiboivia lääkkeitä ovat ritonavir (Norvir), atazanavir/cobicistat (Evotaz) ja darunavir/cobicistat (Prezcobix) (Pizzocolo *et al.* 2011).



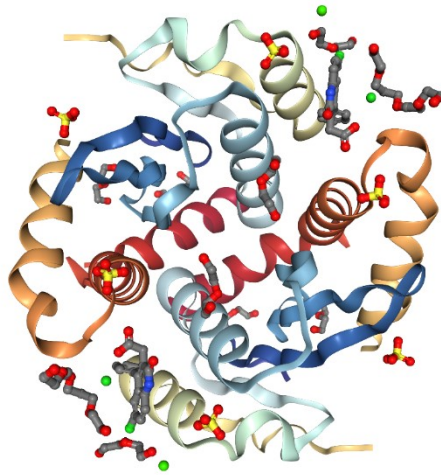
Kuva 5. Proteaasin rakennekuva inhibiittorin sitoutumiskohdassa (Lv *et al.* 2015). Inhibiittoreiden toiminta perustuu pitkälti siihen, että ne matkivat entsyymin substraattia mahdollisimman tarkasti. Ongelmana on kuitenkin ollut entsyymin nopeahko mutatoitumiskyky ja sen seurauksena useat lääkeaineet ovat menettäneet tehonsa. Nykyään tutkitaankin myös, miten proteaasin toimintaa voitaisiin estää enemmän koko solun signaloinnin kannalta (Lv *et al.* 2015).

2.3.5 Integraasi-inhibiittorit

Integraasit toimivat eri viruksilla suhteellisen samalla tavalla toimien viraalisen DNA:n muokkauksessa ja kuljetuksessa isäntäsolun tumaan ja sen muokkauksessa, joka on tärkeää viruksen kyvyllä liittää oma genominsa isäntäsolun DNA:han. Integraatio yleisesti vaatii tietyn kromatiinin kohdan, jossa liitäntä voi tapahtua. Liitäntä tapahtuu poistamalla kummastakin 3'-päästä kaksi nukleotidiä, jonka jälkeen liitäntä tapahtuu kun 3'-pään hydroksyylyiryhmä sitoutuu isäntäsolun DNA:n fosfodiesterisidoksien kanssa (Craigie 2012).

Kuten muut entsyymit, myös integraasia voidaan inhiboida osana HI-viruksen toiminnan estämistä. Integraasille on ollut haastavampaa kehittää lääkekäyttöistä inhibiittoria. Käytetyillä inhibiittoreilla on matala affiniteetti itse integraasikompleksiin, mutta sen sijaan inhibiittoreita sitoutuvat tehokkaammin intasomeihin (Craigie 2012). Intasomet ovat nukleoproteiini-komplekseja, jotka mahdollistavat viraalisen DNA:n integraation isäntäsolun DNA:han integraasin kanssa. Kompleksi ympäröi viraalisen DNA:n päätä (Grawenhoff & Engelman 2017). Inhibiittoreilla pyritäänkin vaikuttamaan viraalisen DNA:n päähän siten, ettei kompleksi pysty muodostumaan, eikä integraatiota tapahtuisi (Hare *et al.* 2010). Yhdysvaltojen elintarvike- ja lääkevirasto (FDA= Food and drug

administration) hyväksyi ensimmäisen lääkeainekäyttöisen integraasiinhibiittorin, raltegravin (Isentress) vasta vuonna 2007 (Craigie 2012).



Kuva 6. Integraasin rakennekaava HI-viruksessa (PDB, HIV Integrase). Inhibiittorien toimintamekanismi perustuu viruksen DNA:n 3'-päähän aktiivisen alueen häirintään, joka johtaa siihen, ettei nukelofiilit kykene hyökkäämään DNA:han (Craigie 2012).

3. Kantasoluterapia HI-viruksen hoidossa

Kantasoluilla tarkoitetaan soluja, joilla on kyky erikoistua joksikin spesifisemmäksi solutyypiksi, kuten T-soluiksi immuunijärjestelmään tai veren punasoluiksi. Kantasolut ylläpitävät erikoistumisellaan yllä elimistön homeostaasia ja ovatkin näistä erinomaisista ominaisuuksista johtuen olleet tutkimuksen kohteena (Nadig 2009).

Kantasoluilla on keskeinen merkitys ihmiskehon immuunipuolustuksessa. T-lymfosyytit kuuluvat niihin soluihin, jotka muodostuvat hematopoieettisista kantasoluista (HSC). T-solujen määrä on normaalissa tilanteessa vakio ja yleisesti alentunut T-lymfosyyttitaso veressä kertoo mm. HI-viruksen mahdollisesta infektoinnista. HIV tuhoaa T-lymfosyyttien CD4+ ja CCR reseptorityypin soluja alentaen solujen määrää veressä (Okoye *et al.* 2012).

Kantasolujen toiminnan ymmärtäminen on jo luonut uusia läpimurtoja erilaisten sairauksien hoidossa. Nykyisin muun muassa leukemian eli verisyövän hoidossa käytetään yleisesti kantasoluterapiaa, jonka avulla potilaalle ikään kuin luodaan uusi immuunijärjestelmä. Leukemian aiheuttama verisyöpä alkaa usein luuytimen soluista ja leviää veren valkosoluihin heikentäen

immuunijärjestelmää (Gero Hutter. 2016, Gribben. 2006) Kantasoluhoidon voidaan harjoittaa joko potilaan omien kantasolujen siirrolla (autologous transfer), jolloin kantasolut säilötään kemoterapian ja muun hoidon ajaksi tai siten, että ulkopuolinen luovuttaja antaa omia terveitä kantasolujaan sairastuneelle (allogeneic transfer) ja näistä soluista muodostuu uusi, voimakkaampi immuunijärjestelmä (Gero Hutter 2016).

Kantasolujen erilaistumista voidaan käyttää teoreettisesti HI-viruksen hoidossa. HAART-terapian aikakautena, ongelmana on ollut se, ettei virusta ole saatu poistettua kokonaan, vaan se jää piileksimään solujen genomiin. HAART-terapian jatkuessa läpi elämän, se on myös suuri kustannus. Tämän vuoksi HIV positiivisten ihmisten hoito kehitysmaissa on haastavaa ja johtaa usein AIDS:in lisääntymiseen. Miten muuten viruksen toiminta voidaan estää ja mahdollisesti jopa poistaa kokonaan? On esitetty teorioita, jotka tarjoavat vaihtoehtoisia strategioita HI-viruksen hoitoon geeniterapian kautta. Geeniterapia ja antiviraaliset lääkkeet tarjoavat myös pitkäaikaishoitoa HIV-infektion saaneiden elämänlaadun parantamiseksi (von Laer *et al.* 2006).

3.1 CTL

Solujen tuhoamisessa keskeisessä roolissa toimii luonnolliset tappajasolut. Yleisin tappajasolu, mitä elimistö itse luonnollisesti käyttää on CTL (Cytotoxic T lymphocytes), jonka hyödyntämistä on tutkittu HIV:n infektoimien solujen spesifisessä tuhoamisessa. CTL:t ovat T-lymfosyyttejä, jotka erittävät sytotoksiinia kohdatessaan infektoituneen tai vioittuneen solun. CTL:n lisäksi käytettävissä on luonnollisiksi tappajiksi kutsuttuja solulinjoja. Luonnollisten tappajasolujen hyötynä on se, että niiden käyttö on turvallisempaa (Liu *et al.* 2017a).

HI-viruksen infektoimat solut voitaisiin tappaa suoraan käyttäen menetelmiä, jotka aktivoisivat infektoituneiden T-solujen apoptoosiherkkyyttä. Tämä voisi toimia esimerkiksi HIV infektoitujen T-solujen CD8- ja CD4 -reseptorien tunnistusmenetelmällä. Tulisi hyödyntää proteiinia, joka tunnistaa HIV glykoproteiini-osaosan reseptorit infektoituneen solun pinnalta ja johtaa soluviestintään. CD4-solujen pinnalla olevien CD4zeta fuusioproteiinien hyödyntäminen on ollut yksi tutkimuksen kohteista, joka kykenee tunnistamaan HIV:n glykoproteiini-osaosan infektoituneiden solujen pinnalta ja välittämään näin viestin CTL-soluille, jotka tuhoavat solun. Vaikka kyseinen menetelmä vaikuttaa lupaavalta, ei se ole valitettavasti aikaansaanut dramaattista vaikutusta virushoidoissa. Syynä on pidetty liian myöhäistä reagointiaikaa, jossa viruksen replikaatio on edennyt liian pitkälle. Ainoana

hoitomuotona tapaus voisi toimia, mikäli viruksen määrää haluttaisiin pienentää. Eli mitä aikaisemmin infektoituneet solut tuhoutuisivat, sitä vähemmän uusia viruspartikkeleita syntyisi (von Laer *et al.* 2006).

3.2 CAR-T/CAR-NK ja luonnolliset tappajasolut

Toinen mahdollisuus liittyisi niin kutsuttuun solun sisäiseen immunisaatioon, jossa käytetään antiviraalisia geenejä vasteena HI-viruksen tartunnalle. Miten tämä sitten toimisi teoriassa? CAR-T (chimeric antigen receptor) eli niin kutsuttu keinotekoinen T-solureseptori on uusi menetelmä, jota pidetään yhtenä merkittävimpanä läpimurtoina soluterapiassa ja muun muassa leukemiatyypin syövän hoidossa (Paszkievicz *et al.* 2016). Ihmisen omia T-soluja eristämällä niihin voidaan liittää keinotekoinen, spesifinen reseptori, joka tunnistaa infektoituneen solun pinnalla sijaitsevat vastereseptorit, tuhoten solun kontrolloidusti ja tehokkaasti. Ideaalinen tapa olisi saavuttaa tilanne, jossa HI-virus ei kykenisi infektoimaan uusia soluja ja T-solujen määrä pysyisi elimistössä näin viitearvoissaan (von Laer *et al.* 2006).

CTL:n lisäksi soluissa voidaan käyttää luonnollisia tappajasoluja, joiden soveltaminen CAR-solujen kanssa tarjoaa lupaavia mahdollisuuksia useiden syöpätyyppien ja infektiotautien hoidossa. Puhutaankin CAR-NK-terapiasta (Liu *et al.* 2017). Entä mitkä ominaisuudet tekevät juuri CAR muokatuista luonnollisista tappajasoluista hyödyllisen? Luonnolliset tappajasolut eli NK-solut reagoivat kohteisiinsa erittäin nopeasti ja ilman aikaisempaa patogeenialtistusta, ja NK-solujen aktivaatiota säätelee ainoastaan stimuloivan reseptorisignaalin voimakkuus (Liu *et al.* 2017). NK-solut eivät myöskään vaadi antigeenispesifisiä reseptoreja toimiakseen, kuten esimerkiksi TCR:ää (T-solu reseptori). Kliinisen hoidon kannalta erittäin hyvä etu on myös se, ettei NK-solujen käytöllä ole yhtä dramaattisia sivuvaikutuksia CAR-T hoidolle alttiille kudoksille, joihin lukeutuu keuhkot, maksa, munuaiset ja lihakset (Curti *et al.* 2011, Liu *et al.* 2017) Menetelmän kontrollointi on hallittua, sillä tapahtumaketju voidaan pysäyttää nopeasti inhibiittoreilla. (Liu *et al.* 2017, Wang *et al.* 2015).

CAR-T:n hyödyntäminen HIV-infektion hoidossa keskittyy NK-solulinjojen modifikaatioon ja näin samalla kehitettäisiin sisäisen immuunipuolustuksen kykyä reagoida nopeammin immuunivasteeseen. NK-solulinjoja voidaan muokata ekspressoimaan CD4zeta reseptoria (Tran *et al.* 1995). Tämän linjan uskotaan kykenevän tuhoamaan yleisesti NK-soluille resistentit solut pintaproteiinien perusteella. Näitä pintaproteiineja ovat muun muassa HI-viruksen kapselin gp120 reseptorit ja tätä voidaan hyödyntää CAR-muokatuissa reseptoreissa, joiden kohteena voi olla

kasvainsolujen lisäksi virusinfektioituneet solut. On myös huomattu, että CAR modifioidut veren kantasolut (HSPCs) kykenevät erilaistumaan funktionaaliseksi, HI-virukselle resistenteiksi NK-soluiksi. Näillä muokatuilla kantasoluilla on potentiaalinen kyky reagoida nopeasti ja spesifisesti HIV-infektioon (Liu *et al.* 2017b).

NK-solujen eristys ja talteenotto verestä on mahdollista nopealla aikataululla ja jatkuvasti jakautuvia solulinjoja on saatavilla kliiniseen käyttöön. Yksi lupaavimmista linjoista on NK92, jonka kliiniset kokeilut ovat tällä hetkellä pisimmällä (Liu *et al.* 2017).

3.3 NK-solut ja HIV

Soluterapian avulla ollaan pyritty ratkaisemaan HIV-infektion yhtä ongelmallisinta ominaisuutta, mihin cART (combination antiretroviral therapy) ja HAART ei kykene. Jotta HI-virus saataisiin poistettua täysin, pitäisi myös eliminoida piiloteleva (latentti), replikaatioon kykenevä provirus. Nämä viruspartikkelit piileksivät infektoitujen T-solujen genomissa passiivisena. NK-soluilla on useita ominaisuuksia, jotka tekevät niistä potentiaalisen hoitomenetelmän HIV-infektioon (Liu *et al.* 2017).

Yksi keskeisimmistä ominaisuuksista, joka NK-soluilla on, on niiden kyky tunnistaa solut, jotka HI-virus on infektoinut. Tartunnan alkuvaiheessa NK-solujen toiminta estyy ja tämä edistää HI-viruksen leviämistä (McMichael *et al.* 2010). Esimerkiksi infektoituneet solut säätelevät ligandien määrää, jotka NK-solut kykenevät tunnistamaan, esimerkkinä ULBP-tyypin (Unique long binding protein) proteiineja (Richard *et al.* 2010).

IFN-gamma toimii solusignaalinnissa tärkeänä välittäjäaineena, jonka tehtävänä on muun muassa nostattaa immuunivastetta akuuttien infektioiden alussa (Henrique Borges da Silva *et al.* 2015). Kyseinen signalointireitti aktivoituu JAK/STAT (Janus activated kinase/Signal transducer and activator of transcription) -signaalitien kautta, kun IFN-tyypin ligandi sitoutuu reseptoriinsa. Tämä aiheuttaa signaalikaskadin, jonka seurauksena STAT-transkriptiotekijät muuttavat solun koko transkriptiota vastaamaan akuuttiin infektiin (Platanias. 2005) NK-solut kykenevät tuottamaan IFN-signaalimolekyylä nopeammin kuin muut immuunisolut tarjoten mahdollisuuden torua virusinfektiota tehokkaammin (Lisovsky *et al.* 2015).

ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) on menetelmä, jota NK-solut hyödyntävät muun muassa tiettyä antigeeniä ilmaisevien syöpäsolujen tuhoamisessa. Ensin antigeenit sitoutuvat kohdesolun kalvoproteiineihin, jotka NK-solut kykenevät tunnistamaan omilla reseptoreillaan. Tästä seuraa degranulaatio, joka vapauttaa solun apoptoosiin johtavia aineita (Orange. 2008, Wang *et al.* 2015). Onkin pohdittu, voisiko ADCC:n hallintaa hyödyntää syöpähoitojen lisäksi myös HI-viruksen infektoimien solujen tuhoamiseen (Liu *et al.* 2017).

NK-solujen käyttöä on myös harkittu käytettävän tuhoamaan auttajasolutyyppiä (CD4⁺ PD-1^{high} Tfh eli auttajasolut, joiden solukuolemaa ohjelmoivien ligandien pitoisuus on suuri), jonka uskotaan olevan passiivisen HI-viruksen lokaatio, kun se on inaktiivisessa muodossa (El-Far *et al.* 2009, Liu *et al.* 2017).

Jos HIV infektoi yleisesti CD4⁺ T-soluja, niin mikseivät NK-solut jaa samaa kohtaloa sitten? Tämä voidaan selittää sillä, etteivät kaikki NK-solut syntetisoi CD4 reseptoreita, joita HI-virus käyttää tunnistamaan infektoitavan solun (Frleta *et al.* 2011). Kliiniseen testaamiseen tarvitaankin siis NK-soluja, jotka ovat CD4-negatiivisia (Liu *et al.* 2017).

3.4 CRISPR -Cas9

Genomin mahdollista muokkausta on harkittu useiden geenisairauksien hoitoon, kuten myös HIV-infektion torjumiseen ja sen lopulliseen eliminoimiseen elimistöstä. CRISPR eli Clustered, regularly interspaced short palindromic repeats on geenin lokus, joka koostuu useista DNA:n toistojakoista ja on nykyisin sovellettu useisiin geeniterapiamuotoihin. Cas9 tarkoittaa entsyymiä, joka toimii kompleksissa kuten sakset leikaten palan halutun osan genomia opastaja RNA:n (guideRNA, gRNA) mukaan (Ophinni *et al.* 2018).

CRISPR/Cas9:n avulla kyetään siis modifioimaan teoriassa HIV:n aiheuttamaa geenimuutosta solussa vaikuttamalla suoraan viruksen eri sykleihin. Esimerkiksi häiritsemällä HIV:n genomin toimintaa ohjelmoimalla gRNA:n sitoutumaan genomin 5' LTR eri kohtiin, joka häiritsisi promoottorin aktiivisuutta ja deaktivoisi proviruksen (Saayman *et al.* 2015).

Toinen harkittu mekanismi olisi käyttää tekniikkaa muokkaamaan CCR5- ja CXCR4-reseptorien toiminnan muokkaamiseen siten, ettei HIVkykenisi tartuttamaan soluja. Kyseiset reseptorit toimivat viruksen infektiossa viruksen kannalta elintärkeässä asemassa ja teoriassa näitä reseptoreja koodaavan geenin muokkaus tarjoaisi varteenotettavan tavan estää uusien tartuntojen leviäminen. HIV:n gp120 reseptorit tarvitsevat juurikin CCR5- ja CXCR4 -tyypin reseptoreja tartunnan

4. Lopuksi

HIV:n lääketieteellinen hoito ja tutkimus on parantunut merkittävästi viime vuosikymmenien aikana johtaen sen akuutin globaalin leviämisen hidastumiseen. HI-viruksen hoidon tulevaisuus näyttääkin valoisalta siinä mielessä, että uusia hoitomenetelmiä on kehitelty erittäin paljon ja vanhoja sovelletaan uusien menetelmien kanssa yhteen. HAART on tarjonnut jo potilailleen mahdollisuuden elää suhteellisen normaalia elämää ja HI-virus ei ole kehittyneissä maissa enää varma kuolemantuomio. Viruksella on vain erittäin vaikeasti poistettava stigma, joka tulisi poistaa lisäämällä tietoisuutta entistäkin enemmän. Tärkeää tiedottamistyötä tekee muun muassa WHO, joka järjestää vuosittain HIV/AIDS päivän, jonka tarkoituksena on kerätä tukea tutkimukselle ja lisätä tietoisuutta. Lisäksi useat tahot, kuten HIV tukikeskus tarjoavat realistista tukea ihmisille, jotka elävät viruksen kanssa.

Vaikka useita menetelmiä on kehitteillä jatkuvasti, vain harva pääsee kliinisiin testeihin mukaan johtuen hoitomenetelmien mahdollisista keholle kohdistuvista rasitteista. Tämän vuoksi on erittäin tärkeää, että mahdollisia hoitoja tutkitaan ja niiden ominaisuuksia verrataan toisiinsa, jotta saataisiin optimoitua hoidon teho ja hyöty.

Meneillä olevan tutkimuksen perusteella huomataan, että edistystä on tapahtunut ja varsinkin lähiaikoina tulee tapahtumaan entistä enemmän. Soluterapian keinoja voidaan nykyisin soveltaa niin syöpäsairauksien, kuin myös infektioautien hoitoon ja ne perustuvat entistä enemmän kehon oman puolustuksen muokkaamiseen ja sen optimointiin suorien lääkeaineiden käytön sijaan.

Käsittelin kandidaatin tutkielmassani HI-virukseen nykyään käytettäviä lääkehoitomuotoja ja mitä mahdollisuuksia soluterapian soveltaminen toisi tutkimukselle ja auttaisi vihdoin löytämään lopullisen hoidon tälle ihmiskuntaa piinaavalle virukselle. Vaikka HIV:n stigma parantumattomana sairautena on vaikea poistaa, ollaan sen saavuttamisessa jo erittäin lähellä. Mielestäni tutkimuksen tärkeyttä ja sen tuottamien tulosten tietoisuutta on tärkeä jakaa sekä yhteiskunnalle, että varsinkin ihmisille, jotka kamppailevat viruksen kanssa päivittäin toivoen, että joku päivä lopullinen parannuskeino löytyy.

5. Kirjallisuus

- Akbar Ali, Rajintha M Bandaranayake, Yufeng Cai, Nancy M King, Madhavi Kolli, Seema Mittal, Jennifer F Murzycki, Madhavi NL Nalam, Ellen A Nalivaika, Aysegül Özen, Moses M Prabu-Jeyabalan, Kelly Thayer & Celia A Schiffer. (2010) Molecular Basis for Drug Resistance in HIV-1 Protease. *Viruses* 2(11): 2509-2535.
- Arts EJ & Hazuda DJ. (2012) HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(4): a007161.
- Boyer PL, Das K, Arnold E & Hughes SH. (2015) Analysis of the Zidovudine Resistance Mutations T215Y, M41L, and L210W in HIV-1 Reverse Transcriptase. *Antimicrob Agents Chemother* 59(12): 7184-7196.
- Centers for disease control and prevention. (2018); About HIV/AIDS. 2018(28.11.) URL: <https://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>
- Clercq ED. (2007) The design of drugs for HIV and HCV. *Nature Reviews Drug Discovery* 6(12): 1001-1018.
- Cloete A, Simbayi LC, Kalichman SC, Strebel A & Henda N. (2008) Stigma and discrimination experiences of HIV-positive men who have sex with men in Cape Town, South Africa. *AIDS Care* 20(9): 1105-1110.
- Craigie R. (2012) The molecular biology of HIV integrase. *Future Virology* 7(7): 679-686.
- Curti A, Ruggeri L, D'Addio A, Bontadini A, Dan E, Motta MR, Trabanelli S, Giudice V, Urbani E, Martinelli G, Paolini S, Fruet F, Isidori A, Parisi S, Bandini G, Baccarani M, Velardi A & Lemoli RM. (2011) Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood* 118(12): 3273-3279.
- El-Far M, Routy J, Sékaly R, Schacker TW, Douek DC, Boulassel M, Ancuta P, Chomont N, Haddad EK, Trautmann L, Ghattas G, Brenchley JM, Yassine-Diab B, Hill BJ, Procopio FA & Boucher G. (2009) HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature Medicine* 15(8): 893-900.
- Ford N, Meintjes G, Vitoria M, Greene G & Chiller T. (2017) The evolving role of CD4 cell counts in HIV care. *World Health Organization*. URL: http://www.who.int/hiv/pub/journal_articles/evolving-role-cd4-cell-count-in-hiv-care/en/
- Frleta D, Altfeld M, Fadda L & Bhardwaj N. (2011) DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nature Reviews Immunology* 11(3): 176-186.
- Gero Hutter. (2016) Stem cell transplantation in strategies for curing HIV/AIDS. *AIDS Research and Therapy* 13(1): 31.
- Grawenhoff J & Engelman AN. (2017) Biological chemistry. *Biological chemistry* 8(1): 32-44.
- Gribben JG. (2009) Stem Cell Transplantation in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 15(1): 53-58.
- Hare S, Gupta SS, Valkov E, Engelman A & Cherepanov P. (2010) Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* 464(7286): 232.
- Hayward A. (2017) Origin of the retroviruses: when, where, and how? *Current Opinion in Virology* 25: 23-27.
- Henrique Borges da Silva, Raíssa Fonseca, José M. Alvarez & Maria Regina D'Império Lima. (2015) IFN- γ Priming Effects on the Maintenance of Effector Memory CD4⁺ T Cells and on Phagocyte Function: Evidences from Infectious Diseases. *Journal of Immunology Research* 2015: 202816-8.
- Joseph S, Arrildt K, Sturdevant C & Swanstrom R. (2015) HIV-1 target cells in the CNS. *J Neurovirol* 21(3): 276-289.

- Karki G. (2017) Structure, genome and proteins of HIV -.URL: <http://www.onlinebiologynotes.com/structure-genome-proteins-hiv/>. (Dec 1, 2018)
- Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J, Bryant SH. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4 & 44(D1): D1202-13. Epub 2015 Sep 22 [PubMed PMID: 26400175] doi: 10.1093/nar/gkv951. (2018) Zidovudine. 2018(Nov 28,).
- Kivisakk P, Trebst C, Liu Z, Tucky Bh, Sorensen Tl, Rudick Ra, Mack M & Ransohoff Rm. (2002) T-cells in the cerebrospinal fluid express a similar repertoire of inflammatory chemokine receptors in the absence or presence of CNS inflammation: implications for CNS trafficking. *Clinical & Experimental Immunology* 129(3): 510-518.
- Kumar V, Cotran R & Robbins S. (1997) *Basic Pathology: Disorders of immune system*, W.B Saunders Company. 6th edition 115-126
- Laurie KL, Guarnaccia TA, Carolan LA, Yan AWC, Aban M, Petrie S, Cao P, Heffernan JM, McVernon J, Mosse J, Kelso A, McCaw JM & Barr IG. (2015) Interval Between Infections and Viral Hierarchy Are Determinants of Viral Interference Following Influenza Virus Infection in a Ferret Model. *Journal of Infectious Diseases* 212(11): 1701-1710.
- Lisovsky I, Isitman G, Song R, DaFonseca S, Tremblay-McLean A, Lebouche B, Routy J, Bruneau J & Bernard NF. (2015) A Higher Frequency of NKG2A⁺ than of NKG2A⁻ NK Cells Responds to Autologous HIV-Infected CD4 Cells irrespective of Whether or Not They Coexpress KIR3DL1. *Journal of Virology* 89(19): 9909-9919.
- Liu D, Tian S, Zhang K, Xiong W, Lubaki N, Chen Z & Han W. (2017) Chimeric antigen receptor (CAR)-modified natural killer cell-based immunotherapy and immunological synapse formation in cancer and HIV. *Protein Cell* 8(12): 861-877.
- Lumio J. (2018a) Elimistöön vastustuskyky (immunitetti). 2018(Nov 20,). dlk01150 (001.041)
- Lumio J. (2018b) HIV (ihmisen immuunikatovirus). 2018(Aug 14,). dlk01189 (001.054)
- Lv Z, Chu Y & Wang Y. (2015) HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care* 2015: 95-104.
- Malim MM & Emerman M. (2008) HIV-1 Accessory Proteins—Ensuring Viral Survival in a Hostile Environment. *Science direct* 3(6): 388-398.
- Margolis A, Heverling H, Pham P & Stolbach A. (2014) A Review of the Toxicity of HIV Medications. *J Med Toxicol* 10(1): 26-39.
- Marsden MD & Zack JA. (2015) Experimental Approaches for Eliminating Latent HIV. *Forum on immunopathological diseases and therapeutics* 6(1-2): 91-99.
- McMichael AJ, Haynes BF, Goonetilleke N, Tomaras GD & Borrow P. (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology* 10(1): 11-23.
- Nadig RR. (2009) Stem cell therapy – Hype or hope? A review. *J Conserv Dent* 12(4): 131-138.
- Okoye AA, Rohankhedkar M, Abana C, Pattenn A, Reyes M, Pexton C, Lum R, Sylwester A, Planer SL, Legasse A, Park BS, Piatak M, Lifson JD, Axthelm MK & Picker LJ. (2012) Naive T cells are dispensable for memory CD4⁺ T cell homeostasis in progressive simian immunodeficiency virus infection. *Journal of Experimental Medicine* 209(4): 641-651.
- Ophinni Y, Inoue M, Kotaki T & Kameoka M. (2018) CRISPR/Cas9 system targeting regulatory genes of HIV-1 inhibits viral replication in infected T-cell cultures. *Scientific reports* 8(1): 7784-12.
- Orange JS. (2008) Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 8(9): 713-725.

- Paszkiwicz PJ, Fräßle SP, Srivastava S, Sommermeyer D, Hudecek M, Drexler I, Sadelain M, Liu L, Jensen MC, Riddell SR & Busch DH. (2016) Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *J Clin Invest* 126(11): 4262-4272.
- Pizzocolo C, Castagna A & Lazzarin Adriano. (2011) HIV Protease Inhibitors: Present and Future. *Future Virology* 6(5): 571-580.
- Platanias LC. (2005) Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology* 5(5): 375-386.
- Reiner et al. 2. (2016) Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 43(3): 203-222.
- Richard J, Sindhu S, Pham TNQ, Belzile J & Cohen EA. (2010) HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* 115(7): 1354-1363.
- Saayman S, Ali SA, Morris KV & Weinberg MS. (2015) The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opinion on Biological Therapy* 15(6): 819-830.
- Sabin CA & Phillips AN. (2009) Should HIV therapy be started at a CD4 cell count above 350 cells/μl in asymptomatic HIV-1-infected patients? *Current Opinion in Infectious Diseases* 22(2): 191.
- Scruggs ER & Dirks Naylor AJ. (2008) Mechanisms of Zidovudine-Induced Mitochondrial Toxicity and Myopathy. *Pharmacology* 82(2): 83-88.
- Steven J Smith, Gary T Pauly, Aamir Akram, Kevin Melody, Ganesha Rai, David J Maloney, Zandrea Ambrose, Craig J Thomas, Joel T Schneider & Stephen H Hughes. (2016) Rilpivirine analogs potently inhibit drug-resistant HIV-1 mutants. *Retrovirology* 13(1).
- Taubenberger JK & Morens DM. (2008) The Pathology of Influenza Virus Infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 3: 499-522.
- Tran AC, Zhang D, Byrn R & Roberts MR. (1995) Chimeric zeta-receptors direct human natural killer (NK) effector function to permit killing of NK-resistant tumor cells and HIV-infected T lymphocytes. *The journal of immunology* 155(2): 1000-1009.
- Uchil PD & Mothes W. (2009) HIV Entry Revisited. *Cell* 137(3): 402-404.
- von Laer D, Hasselmann S & Hasselmann K. (2006) Gene therapy for HIV infection: what does it need to make it work? *The Journal of Gene Medicine* 8(6): 658-667.
- Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS & Sondel PM. (2015) NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* 6: 368.
- WHO. (2018a) HIV/AIDS Key facts, <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>, (Dec 1, 2018)
- WHO. (2018b) WHO | Data and statistics. 2018(Dec 1,).
- Yu S, Yao Y, Xiao H, Li J, Liu Q, Yang Y, Adah D, Lu J, Zhao S, Qin L & Chen X. (2018) Simultaneous Knockout of CXCR4 and CCR5 Genes in CD4+ T Cells via CRISPR/Cas9 Confers Resistance to Both X4- and R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Human Gene Therapy* 29(1): 51-67.
- Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, Wang G & Zou W. (2012) Bone marrow and the control of immunity. *Cellular & Molecular Immunology* 9(1): 11-19.