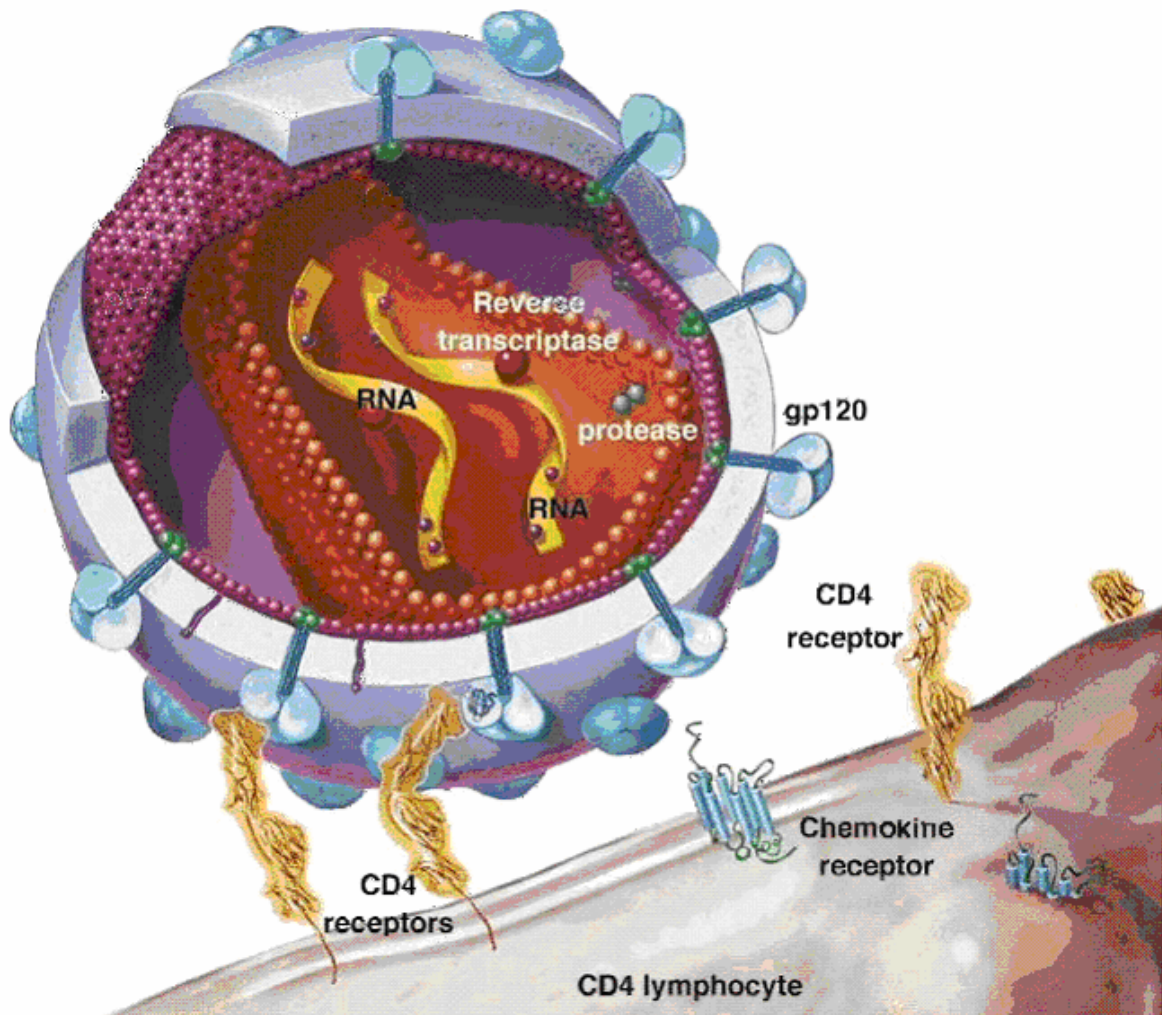


# Het effect van single nucleotide polymorfismes in Trim5α op pathogenese van HIV-1 infectie



|                      |                                                            |
|----------------------|------------------------------------------------------------|
| Naam:                | Judith Burger                                              |
| Onderwijsinstelling: | Hogeschool Utrecht, Institute of Life Sciences & Chemistry |
| Opleiding:           | Biologie en Medisch Laboratoriumonderzoek                  |
| Afstudeerrichting:   | Moleculaire Biologie                                       |
| Schoolbegeleider:    | Anja ter Avest                                             |
| Stage instelling:    | Sanquin                                                    |
| Afdeling:            | Klinische Viro Immunologie                                 |
| Stagebegeleider:     | Neeltje Kootstra                                           |
| Stageperiode:        | november 2006 – juni 2007                                  |

# Voorwoord

Dit verslag is geschreven als onderdeel van mijn afstudeerstage van het HLO, richting Moleculaire Biologie aan de Hogeschool van Utrecht, afdeling Institute of Life Sciences & Chemistry.

De afgelopen 6,5 maand heb ik mijn afstudeerstage gelopen op de afdeling Klinische Viro Immunologie bij Sanquin Research in Amsterdam.

Deze afstudeerstage heb ik ervaren als een zeer leerzame en erg leuke periode. Met name wil ik mijn stagebegeleidster Neeltje Kootstra bedanken voor de praktische en theoretische begeleiding van mijn onderzoek. Voor de praktische begeleiding op het lab wil ik ook Karel van Dort en Corrine Beugeling bedanken. Verder wil ik ook alle medewerkers en studenten van de afdeling bedanken voor de gezellige en leerzame periode. Voor de begeleiding vanuit school wil ik graag Anja ter Avest bedanken.

Judith Burger  
Amsterdam  
Mei 2007

Figuur titelpagina:

<http://images.google.nl/imgres?imgurl=http://www.rhodes.edu/biology/glindquester/viruses/pagespass/hiv/attachment.jpg&imgrefurl=http://www.rhodes.edu/biology/glindquester/viruses/pagespass/hiv/hiv.html&h=582&w=674&sz=149&hl=nl&start=39&tbnid=XiHw39WBaRkRZM:&tbnh=119&tbnw=138&prev=/images%3Fq%3Dhiv%2Bvirus%26start%3D20%26gbv%3D2%26ndsp%3D20%26snum%3D10%26hl%3Dnl%26sa%3DN>

## Samenvatting

Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) wordt veroorzaakt door het Humaan Immunodeficientie Virus (HIV). Dit virus behoort tot de familie van de retrovirussen. Wereldwijd zijn er ongeveer 40 miljoen mensen besmet met HIV-1. De HIV-1 replicatie kan geremd worden door Trim5 $\alpha$ . Trim5 $\alpha$  is een cellulair eiwit dat in staat is HIV-1 replicatie in een vroege stap na entry, maar voor reverse transcriptie te remmen.

Het doel van het onderzoek is het bestuderen van de invloed van single nucleotide polymorfismes in het Trim5 $\alpha$  gen op de gevoeligheid van personen met de verschillende SNPs voor HIV-1 infectie en het verloop van de HIV-1 infectie. In totaal komen er 5 coding SNPs voor in het Trim5 $\alpha$  gen: H43Y, V112F, R136Q, G249D en H419Y. Deze 5 SNPs worden in drie verschillende groepen getest, namelijk 104 HIV-1 negatieve controles, 170 HIV-1 geïnfecteerde individuen en 46 High Risk Seronegative individuen.

Om de SNPs aan te tonen werd eerst PBMC geïsoleerd uit bloed of uit een buffy coat, vervolgens werd hier het DNA uit geïsoleerd. Op dit DNA werd een PCR uitgevoerd en de SNP werd aangetoond door middel van een digestie met een restrictie-enzym of een sequentie reactie. Individen uit de drie groepen werden geanalyseerd op de aanwezigheid van de H43Y, V112F, R136Q en H419Y SNP en het effect van deze SNPs op HIV-1 ontvankelijkheid en HIV-1 ziekte progressie werd bestudeerd. Voor de G249D SNP is de detectie methode opgezet en deze wordt getest in de drie verschillende groepen.

In zowel de allel als de genotype frequenties van de verschillende SNPs in het Trim5 $\alpha$  gen werden er geen significante verschillen gevonden tussen de HIV-1 negatieve controles, HIV-1 geïnfecteerde en HRSN individuen. Dit betekent dat geen van de SNPs in het Trim5 $\alpha$  gen invloed heeft op de gevoeligheid van een persoon voor HIV-1 infectie. Verder werd er gevonden dat de H43Y, V112F en de H419Y SNP geen effect hebben op ziekte progressie. Alleen voor de R136Q SNP werd er een effect op het verloop van de infectie gevonden. In de totale groep werd er geen effect op het verloop van de infectie gevonden. Vervolgens werd de groep gesplitst in mensen die AIDS krijgen met alleen CCR5 gebruikende virussen (R5-progressors) en mensen die tijdens het verloop van de infectie CXCR4 gebruikende virussen ontwikkelen (X4-progressors). In de R5-progressors werd er ook geen effect van de R136Q SNP op ziekte progressie gevonden. In de X4-progressors werd er gevonden dat mensen die hetero- of homozygoot zijn voor de R136Q SNP een gunstiger ziekte verloop hebben. Er werd gevonden dat deze mensen er langer over deden om CD4 aantal beneden de 400 en 200 cellen per  $\mu$ l te bereiken. Ook werd er gevonden dat het aantal CD4 cellen op 1,5 en 5 jaar hoger waren in vergelijking met de CD4 aantallen van mensen die de R136Q SNP niet hebben. Verder werd er gevonden dat de virale RNA load op 5 jaar na infectie significant lager is in mensen die homozygoot voor de R136Q SNP zijn. Hieruit werd geconcludeerd dat de R136Q SNP geassocieerd is met een langzamer ziekte verloop in X4-progressors en dat dit mogelijk samenhangt met het CXCR4 gebruik van het virus.

## Summary

Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) is caused by the Human Immunodeficiency Virus (HIV). This virus belongs to the family of the retroviruses. Worldwide there are more than 40 million people infected by HIV-1. The HIV-1 replication can be inhibiting by Trim5 $\alpha$ . Trim5 $\alpha$  is a cellular protein which is able to inhibit the HIV-1 replication in an early step after entry but before the process of reverse transcription.

In this study the effect of single nucleotide polymorphisms in the Trim5 $\alpha$  gene on the susceptibility of an individual for HIV-1 infection and the effect on the course of HIV-1 infection was analyzed. There are 5 known coding SNPs in the Trim5 $\alpha$  gene: H43Y, V112F, R136Q, G249D en H419Y. Three different groups were analyzed for the presence of these 5 SNPs: 104 HIV-1 negative controls, 170 HIV-1 infected individuals and 46 High Risk Seronegative individuals.

PBMC's from these individuals were isolated out of blood or buffy coat and DNA was isolated. SNPs were detected by PCR and subsequent digestion with a restriction-enzyme or by sequencing. Individuals from the three groups were analyzed for the presence of the H43Y, V112F, R136Q and H419Y SNP and the effect of these SNPs on HIV-1 susceptibility and HIV-1 disease progression was analyzed. The detection method for the G249D SNP was established and currently individuals from the three different groups are screened for this SNP.

No significant difference in the allele and genotype frequencies of the different SNPs in the Trim5 $\alpha$  gene were observed between the HIV-1 negative controls, HIV-1 infected and HRSN individuals. This indicates that none of the SNPs in the Trim5 $\alpha$  gene analyzed had an effect on the susceptibility of an individual for HIV-1 infection. In the HIV-1 positive individuals it was observed that the H43Y, V112F and the H419Y SNP had no effect on the disease progression. Also no effect on the disease progression of the R136Q SNP was observed in the total group. However, when the group was split in individuals who progress to AIDS with only CCR5 using viruses (R5-progressors) and individuals who develop viruses that use CXCR4 during progression (X4-progressors), an effect of the R136Q SNP on disease progression was observed in the X4-progressors. In the X4 progressors, individuals that were hetero- or homozygous for the R136Q SNP had slower disease progression and reached CD4 counts below 400 and 200 cells per  $\mu$ l at a later timepoint after seroconversion as compared to individuals without the SNP. X4-progressors that were positive for the SNP also had higher CD4 cell counts at 1,5 and 5 year after seroconversion as compared to individuals who didn't have the R136Q SNP. In addition a significant lower viral RNA load at 5 year after infection was observed in individuals who are homozygous for the R136Q SNP. These results demonstrate that the R136Q SNP is associated with a slower disease progression in only the X4-progressors. This might indicate that the co-receptor use of the virus might be important and that CXCR4-using variants are more sensitive to Trim5 $\alpha$ .

# Afkortingen

|        |                                            |
|--------|--------------------------------------------|
| AIDS   | Acquired Immune Deficiency Syndrome        |
| APS    | Ammonium Persulfate                        |
| BDT    | Big Dye Terminator                         |
| CCR5   | CC chemokine receptor 5                    |
| CTL    | Cytotoxische CD8 <sup>+</sup> T Lymfocyten |
| CXCR4  | CXC chemokine receptor 4                   |
| DNA    | Deoxyribonucleic acid                      |
| dNTP   | Deoxyribonucleotide triphosphate           |
| EDTA   | Ethyleen Diamine Tetra Azijnzuur           |
| FV     | Foamy Virus                                |
| HIV-1  | Human Immunodeficiency Virus type 1        |
| HLA-1  | Human Leucocyte Antigen class 1            |
| HRSN   | High Risk SeroNegative                     |
| LRT    | Long Terminal Repeats                      |
| MHC-1  | Major Histocompatibility Complex class 1   |
| MLV    | Murine Leukemia Virus                      |
| mRNA   | messenger RNA                              |
| ORF    | Open Reading Frame                         |
| PBMC   | Peripheral Blood Mononuclear Cell          |
| PBS    | Phosphate Buffered Saline                  |
| PCR    | Polymerase Chain Reaction                  |
| RNA    | Ribonucleic acid                           |
| SDF-1  | Stromal cell-derived factor 1              |
| SIV    | Simian Immunodeficiency Virus              |
| SNP    | Single Nucleotide Polymorphism             |
| TAE    | Tris-azijnzuur-EDTA buffer                 |
| TBE    | Tris-Borate-EDTA buffer                    |
| TCR    | T-cel receptor                             |
| TNC    | Tri Natrium Citraat                        |
| Trim5α | Tripartite Motif Family 5 alpha protein    |

# Inhoudsopgave

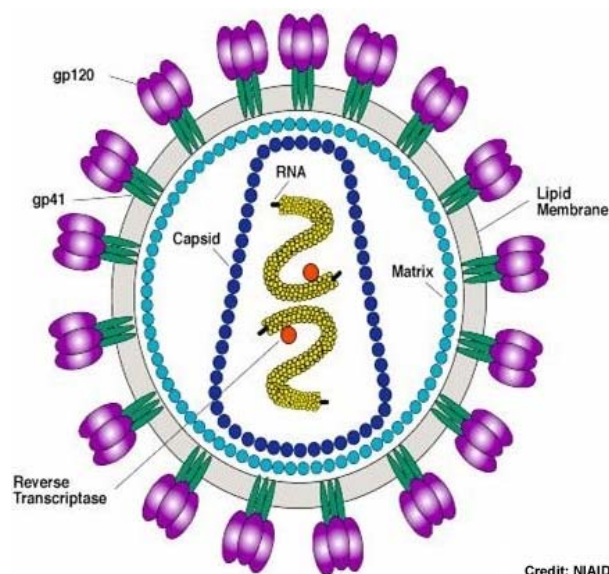
|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Inleiding</b>                                                              | <b>1</b>  |
| 1.1 Retrovirussen                                                                | 1         |
| 1.2 Replicatie                                                                   | 2         |
| 1.3 Epidemiologie                                                                | 4         |
| 1.4 HIV-1 pathogenese                                                            | 4         |
| 1.5 Effect genetische polymorfismes op HIV-1                                     | 5         |
| 1.6 Trim5 $\alpha$                                                               | 6         |
| 1.7 Doel van het onderzoek                                                       | 6         |
| <b>2. Materiaal en methode</b>                                                   | <b>8</b>  |
| 2.1 Monsterverzameling                                                           | 8         |
| 2.2 Isolatie van PBMC uit een buffy coat of bloed                                | 8         |
| 2.3 DNA isolatie                                                                 | 8         |
| 2.4 PCR                                                                          | 9         |
| 2.5 Opzuiveren van het PCR product volgens GFX zuivering                         | 10        |
| 2.6 Detectie methode van de verschillende SNPs met behulp van restrictie-enzymen | 10        |
| 2.6.1 Digestie met restrictie-enzymen                                            | 10        |
| 2.6.2 Detectie van een SNP met behulp van een agarose gel                        | 10        |
| 2.6.3 Detectie van een SNP met behulp van Acryl-Amide gelen                      | 11        |
| 2.7 Sequentie reactie                                                            | 11        |
| <b>3. Resultaten</b>                                                             | <b>13</b> |
| 3.1 Opzetten van de SNP bepalingen                                               | 13        |
| 3.1.1 Opzetten van de V112F SNP bepaling                                         | 13        |
| 3.1.2 Opzetten van de H419Y SNP bepaling                                         | 13        |
| 3.1.3 Opzetten van de G249D SNP bepaling                                         | 14        |
| 3.1.4 Bepaling van de H43Y en R136Q SNP                                          | 15        |
| 3.2 SNP frequentie in relatie tot de gevoeligheid van een HIV-1 infectie         | 16        |
| 3.2.1 Frequentie analyse voor de H43Y SNP                                        | 16        |
| 3.2.2 Frequentie analyse voor de V112F SNP                                       | 16        |
| 3.2.3 Frequentie analyse voor de R136Q SNP                                       | 17        |
| 3.2.4 Frequentie analyse voor de H419Y SNP                                       | 17        |
| 3.3 De invloed van de SNP op het verloop van een HIV-1 infectie                  | 18        |
| 3.3.1 De invloed van de H43Y SNP op ziekte progressie                            | 19        |
| 3.3.2 De invloed van de V112F SNP op ziekte progressie                           | 20        |
| 3.3.3 De invloed van de R136Q SNP op ziekte progressie                           | 21        |
| 3.3.4 De invloed van de H419Y SNP op ziekte progressie                           | 23        |
| <b>4. Discussie en conclusie</b>                                                 | <b>25</b> |
| <b>5. Literatuurlijst</b>                                                        | <b>30</b> |
| <b>6. Bijlage</b>                                                                | <b>32</b> |
| I Lijst met alle significante waarde van de verschillende SNPs                   | 32        |
| II Nucleotide en aminozuursequentie van Trim5 $\alpha$ van de verschillende SNPs | 38        |

# 1. Inleiding

## 1.1 Retrovirussen

Het Humaan Immunodeficiëntie Virus type 1 (HIV-1) is een retrovirus en behoort tot de subfamilie van de lentivirussen.

Retrovirussen zijn een grote familie van envelop RNA virussen en kunnen onderverdeeld worden in oncoretrovirussen, lentivirussen en spumavirussen. Het virus deeltje bevat twee kopieën van het virale RNA genoom, welke omringt wordt door een kegel-achtige kern wat capsid genoemd wordt. Het virale RNA bevat drie essentiële genen namelijk groep specifieke genen (Gag), polymerase (Pol) en envelop (Env) en wordt geflankeerd door de long terminal repeats (LTR). Deze LTRs zijn essentieel voor reverse transcriptie, provirale integratie en transcriptionele activatie. Gag zorgt voor de expressie van de structurele eiwitten: capsid (CA), matrix (MA) en nucleocapsid (NC). Deze worden voortgebracht door de proteolytische klieving van het Gag voorloper eiwit. Pol zorgt voor de expressie van de virale enzymen protease (PR), reverse transcriptase (RT) en integrase (IN). Deze enzymen stammen af van het Gag-Pol voorloper eiwit. Env zorgt voor de expressie van de envelop glycoproteïnen, welke betrokken zijn bij virus entry [1]. Bij HIV-1 zijn het oppervlakte eiwit gp120 en transmembraan eiwit gp41 de glycoproteïnen. In figuur 1 is een illustratie van het HIV virus weergegeven.



**Figuur 1** Het HIV virus.

Afkomstig van: <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>

Oncoretrovirussen zijn simpele virussen die alleen coderen voor de structurele genen Gag, Pol en Env. Een voorbeeld van een oncoretrovirus is het murine leukemia virus (MLV; figuur 2A). Lentivirussen en spumavirussen hebben een complexere organisatie en coderen voor bijkomende virale eiwitten.

Lentivirussen coderen voor drie tot zes bijkomende virale eiwitten die essentieel zijn voor virusreproductie en bij het aanhouden van infectie. Twee van de accessoire eiwitten, Tat (transcriptional transactivator) en Rev (regulator of virion gene expression), zijn aanwezig in alle lentivirussen. Tat induceert de transactivatie van virale transcriptie en Rev reguleert de nucleaire export van ongespliced RNA [1]. Verder bevat het HIV-1 virus ook nog Nef

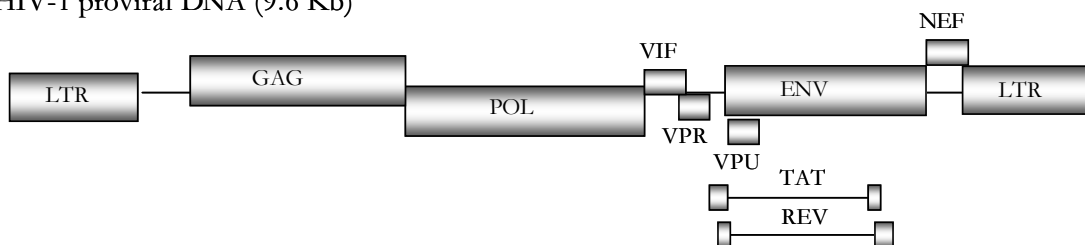
(negative effector factor) welke invloed heeft op de infectiviteit van het virus en Vif (viral infectivity factor) welke de antivirale activiteit van het humane eiwit APOBEC3G vermindert. Vif bindt aan APOBEC3G en veroorzaakt hiermee afbraak in productie cellen voordat het virion is ingebouwd. Verder vergemakkelijkt Vpr (viral protein r) het nucleaire transport en Vpu (viral protein u) is samen met Nef betrokken bij de neerwaartse regulatie van de HIV-1 CD4 receptor en HLA klasse I. In figuur 2B is een schematische presentatie van de provirale DNA organisatie van HIV-1 weergegeven.

Spumavirussen, ook wel foamy virussen (FV) genoemd, bevatten naast de structurele eiwitten drie open reading frames (ORFs) namelijk Bel1, Bel2 en Bel3, waarvan Bel1 is geïdentificeerd als een co-activator van virale transcriptie (figuur 2C) [1].

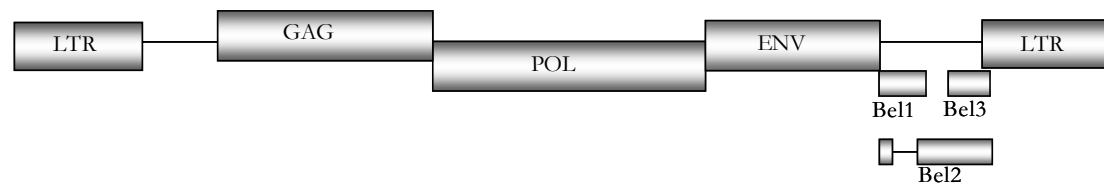
A. MLV proviral DNA (8.8 Kb)



B. HIV-1 proviral DNA (9.6 Kb)



C. FV proviral DNA (12.3 Kb)



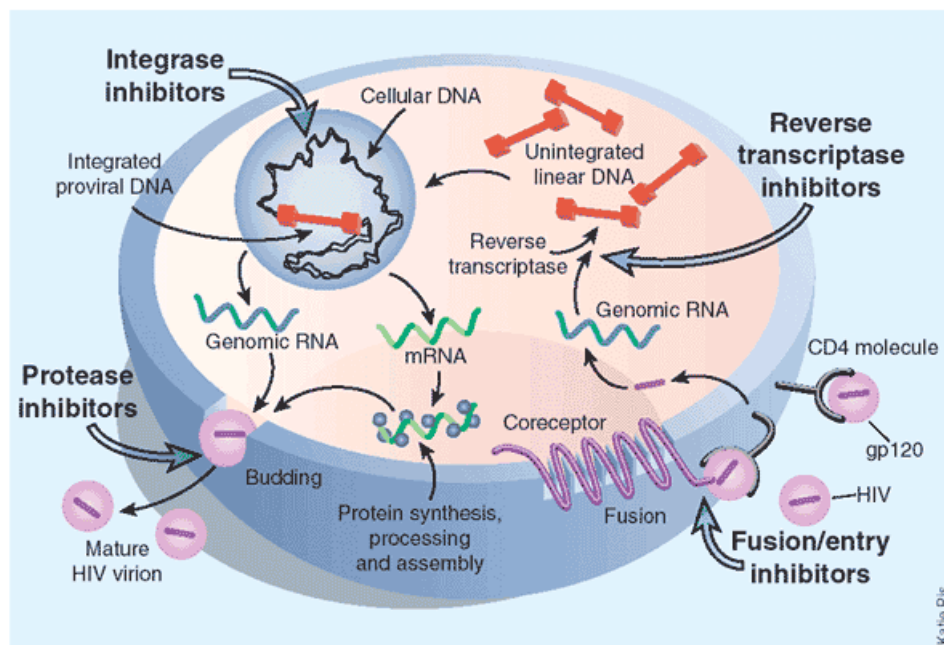
**Figuur 2** Schematische presentatie van de provirale DNA organisatie van retrovirussen [1]. (A) Het MLV (oncoretrovirus) bevat Gag, Pol en Env coderende gebieden geflankeerd door LTRs. (B) Het HIV-1 provirale DNA codeert voor de zes bijkomende eiwitten Vif, Vpr, Vpu, Tat, Rev en Nef. (C) Het FV provirus bevat 3 bijkomende ORFs: Bel1, Bel2 en Bel3.

## 1.2 Replicatie

De infectie van HIV-1 begint met de aanhechting van virus deeltjes aan het cel oppervlak doordat het virale gp120 een interactie aangaat met het CD4 molecuul op T cellen. Na een conformatie verandering in gp120 vindt er een interactie plaats met een co-receptor. De geïdentificeerde chemokine co-receptoren zijn CXCR4 (X4 progressors), gevonden op CD4<sup>+</sup> T cellen, en CCR5 (R5 progressors), gevonden op CD4<sup>+</sup> T cellen en macrofagen. Onafhankelijk van de transmissie route, wordt de CCR5 co-receptor het meest gebruikt bij nieuwe infecties. Virussen die de CXCR4 co-receptor gebruiken verschijnen laat in infectie in ongeveer de helft van de geïnfecteerde patiënten en deze virus varianten hebben een verhoogde replicatie capaciteit en zijn geassocieerd met ziekte progressie. In sommige individuen hebben de R5 progressors ook een verhoogde replicatie capaciteit in vergelijking met de infecterende R5 stam. Ook zijn er virus varianten gevonden die beide co-receptoren kunnen gebruiken, dit zijn de X4R5 gebruikende virussen [2].

Na binding aan de co-receptoren fuseren het virale en cellulaire membraan doordat het virale gp41 poriën in het plasmamembraan vormt en vervolgens komt het virale capsid in het

cytoplasma van de cel terecht. De fase na entry in het cytoplasma, maar voor voltooiing van reverse transcriptie en entry in de kern wordt uncoating genoemd. Hier wordt het capsid opgebroken en wordt het virale RNA door het enzym reverse transcriptase omgezet in dubbelstrengs proviraal DNA [2,3,4]. Het preintegratie complex bestaat uit het provirale DNA en de virale eiwitten nucleocapsid, reverse transcriptase en integrase [5]. Het preintegratie complex wordt naar de kern getransporteerd en gaat de kern binnen door een porie in de kern membraan. Hier integreert het provirale DNA in het gastheergenoom met behulp van het virale enzym integrase. Voor de productie van nieuwe virussen activeren gastheer transcriptie factoren de transcriptie van de LTR, waardoor er nieuwe virus genomen en mRNA geproduceerd worden. In het cytoplasma worden de virale eiwitten gesynthetiseerd en worden nieuwe virus partikels gevormd aan de plasmamembraan (figuur 3). De virus partikels verlaten de cel door middel van budding door de plasmamembraan. Tijdens het budding proces worden de Env glycoproteïnen ingebouwd in het virale membraan. In de nieuw gevormde virionen worden de Gag en Gag-Pol voorloper eiwitten gekliefd door het virale enzym protease wat resulteert in de rijping van het virion [1].



**Figuur 3** De replicatiecyclus van het HIV virus.

Afkomstig van: <http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/AIDS/treatment.html>

Het belangrijkste verschil tussen foamy virussen en andere retrovirussen is dat bij foamy virussen reverse transcriptie laat in de replicatie cyclus plaatsvindt. Reverse transcriptie vindt plaats tijdens de virus productie voordat het virus vrijkomt uit de cel. Het is daarom ook lastig om FV in te delen als DNA of RNA virussen [6]. Verder is het verschil tussen lentivirussen en oncoretrovirussen dat deze laatste celdeling nodig hebben om in de kern te komen en niet getransporteerd kunnen worden over het kernmembraan.

De verschillende retrovirussen gebruiken ook andere receptoren en co-receptoren. HIV-1 valt onder de lentivirussen, waar ook HIV-2 en SIV onder vallen. Deze lentivirussen gebruiken CD4, CCR5 en CXCR4 als receptor, maar er zijn wel verschillen in receptor binding tussen deze drie lentivirussen. Er bestaan CD4-onafhankelijke HIV-2 virussen die alleen de chemokine receptor (CCR5 en CXCR4) nodig hebben voor binding, fusie en entry. Er zijn

ook enkele voorbeelden hiervan in HIV-1 en SIV. De frequentie van deze varianten in een natuurlijke infectie is onduidelijk. Omdat CD4-onafhankelijke varianten geen interactie met CD4 aangaan, wordt er gedacht dat hun gp120 subunit al in de conformatie is dat de chemokine receptor bindingsplaatsen toegankelijk zijn. Er wordt gespeculeerd dat lentivirussen die de CD4 binding nodig hebben voor infectie de chemokine receptor bindingsplaats van gp120 afschermen voor het immuunsysteem. Er is echter minder bekend over de receptoren in de andere retrovirale groepen. Wel is bekend dat oncoretrovirussen gebruik maken van verschillende receptoren, waarvan MLV gebruik maakt van Pit1/Pit2. De receptoren die voor foamy virussen gebruikt worden zijn echter nog niet geïdentificeerd [7].

### 1.3 Epidemiologie

Het Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) werd voor het eerst in 1981 beschreven in de VS [8]. Wereldwijd wordt het aantal HIV-1 geïnfecteerde op 40 miljoen geschat, en dat er 25 miljoen mensen hieraan zijn overleden. Het merendeel daarvan woont in Afrika, in het gebied ten zuiden van de Sahara en Zuidoost Azië [8]. Meer dan 80% van de met HIV geïnfecteerde personen leeft in ontwikkelingslanden [9]. Heteroseksuele transmissie is de belangrijkste transmissie route en is verantwoordelijk voor 85% van alle HIV-1 infecties wereldwijd [2]. HIV wordt overgedragen via seksueel contact, via bloed of bloedproducten (naalden), tijdens de zwangerschap, de bevalling en het geven van borstvoeding.

### 1.4 HIV-1 pathogenese

HIV-1 virus bindt zich specifiek aan een bepaald soort witte bloedcellen, de CD4<sup>+</sup> T-lymfocyten. Omdat CD4 cellen ook functioneren als belangrijkste receptor voor het virus, zijn deze helper T cellen zeer ontvankelijk voor het virus. Het virus gebruikt deze CD4-cellen om zich te vermenigvuldigen, waarna deze cellen dood gaan.

Er zijn een aantal belangrijke ziektestadia van een HIV-infectie. Ten eerste vindt seroconversie plaats in de eerste drie tot zes maanden na besmetting met HIV, waarin antistoffen in het bloed aantoonbaar worden. Een primaire HIV-1 infectie verloopt vaak asymptomatisch, maar 50% van de patiënten ontwikkelen griepachtige symptomen in de eerste vier weken na infectie. Gedurende primaire infectie is de virus titer extreem hoog in perifeer bloed (tot 10<sup>8</sup> HIV-1 RNA kopieën/ml plasma) en daalt het aantal CD4<sup>+</sup> T lymfocyten significant. Gedurende primaire infectie, en meestal eerder dan seroconversie, vindt activatie plaats van HIV-1 specifieke cytotoxische CD8<sup>+</sup> T lymfocyten (CTL). CTL herkenning van HIV-1 geïnfecteerde antigeen-presenterende cellen vindt plaats door de T-cel receptor (TCR). CTL TCR bindt aan virale peptides die geassocieerd zijn met MHC-I moleculen op het oppervlak van geïnfecteerde cellen en induceert de vrijlating van proteases en perforin wat leidt tot lysis van de geïnfecteerde cellen [3]. Na de start van de HIV-1 specifieke cellulaire immuunrespons en de erop volgende synthese van HIV-1 specifieke antilichamen daalt de virale belasting van het plasma. Zolang het immuunsysteem de virus replicatie onder controle houdt verloopt de HIV-1 infectie asymptomatisch.

Door de voortdurende replicatie van het virus ontstaan mutaties in het virale genoom die het virus in staat stellen om aan het immuunsysteem te ontkomen. Het immuunsysteem heeft op een bepaald moment geen vat meer op de virus replicatie. Als gevolg hiervan vermindert het aantal CD4<sup>+</sup>-lymfocyten in het bloed steeds sneller, en wordt het immuunsysteem aangetast. Door het falende immuunsysteem wordt de geïnfecteerde persoon steeds ontvankelijker voor opportunistische infecties die tot de dood kunnen leiden [3]. Opportunistische infecties zijn infecties die alleen optreden bij mensen met een ernstig verminderde weerstand. Men spreekt vaak van AIDS als het aantal CD4-cellen lager ligt dan 200 cellen per µl bloed of als er

klinische symptomen zijn [8,9,10]. Een gezonde persoon heeft doorgaans tussen de 500 en 1500 CD4-cellen per  $\mu$ l bloed.

## 1.5 Effect genetische polymorfismes op HIV-1

Het ziekte verloop van HIV-1 infectie varieert heel erg tussen verschillende personen. Sommige mensen ontwikkelen AIDS binnen een periode van 3 jaar na infectie terwijl andere mensen na een periode van 10 jaar nog steeds geen ziekte verschijnselen vertonen. Ook zijn er mensen gevonden die wel zijn blootgesteld aan het virus maar niet geïnfecteerd zijn geraakt. Waarom de infectie zo verschillend verloopt is nog steeds niet helemaal duidelijk, maar genetische factoren spelen hier in ieder geval een rol bij.

Er is veel onderzoek gedaan naar het verloop van HIV-1 infectie en genetische polymorfismes (mutaties) in de chemokine receptoren die door HIV-1 kunnen worden gebruikt en naar de chemokines, wat de natuurlijke liganden zijn van de receptoren. Chemokine receptoren (CCR5 en CXCR4) zijn cellulaire receptoren voor chemokines. Chemokines zijn kleine peptides in de cytokine familie die uitgescheiden worden door cellen en dienen voor de regulatie van chemotaxis (de beweging van cellen), adhesie en de activiteit van immuun verantwoordelijke cellen en weefsels [11]. Deze receptoren hebben een G-eiwit gekoppeld, 7-transmembraan structuur bestaande uit extra- en intracellulaire loops [12].

In sommige gevallen beïnvloeden polymorfismes de binding tussen de chemokines en de receptor, dit zou ook binding van HIV-1 aan de co-receptoren kunnen beïnvloeden.

Kort nadat CCR5 was geïdentificeerd als co-receptor voor HIV-1 entry, werd er een deletie van 32 basenparen geïdentificeerd in het open reading frame in het CCR5 gen in een aantal personen bij wie een hoog risico voor HIV-1 infectie was vast gesteld maar die vrij bleven van infectie. De bloedcellen van deze mensen waren resistent voor infectie met virussen die CCR5 voor entry gebruiken. Deze deletie van 32 basenparen in het CCR5 gen (CCR5 $\Delta$ 32) resulteert in een disfunctioneel eiwit die niet tot expressie komt op het cel oppervlak. HIV-1 infectie in personen homozygoot voor CCR5 $\Delta$ 32 is zeer zeldzaam en vindt alleen plaats als de virale stam CXCR4 gebruikt voor virale entry. Heterozygote individuen met 1 CCR5 $\Delta$ 32 allel en 1 wildtype allel hebben een gunstiger verloop van HIV-1 infectie en ontwikkelen later AIDS in vergelijking met mensen die alleen het wildtype gen hebben. Deze mutatie komt vooral voor onder de blanke bevolking [11].

CCR2 is een andere co-receptor voor HIV-1, en een polymorfisme op positie 64 van het CCR2 gen (CCR2-64I) heeft ook invloed op de ziekte progressie. Hier verandert aminozuur valine in isoleucine. Net als het CCR5 $\Delta$ 32 genotype is ook het CCR2-64I polymorfisme geassocieerd met een gunstiger verloop van de infectie. Mensen die dit polymorfisme hebben ontwikkelen later AIDS. In tegenstelling tot CCR5 $\Delta$ 32 komt het CCR2-64I allel voor bij een bredere etniciteit [11].

Er is ook een polymorfisme gevonden in het stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) gen. Deze mutatie ligt in het niet vertaalde gebied van het gen (SDF1-3'A) en hier verandert een G nucleotide in een A nucleotide. Het effect van dit polymorfisme op HIV-1 infectie is ook bestudeerd, maar het is niet duidelijk of dit polymorfisme echt een rol speelt. Sommige studies laten zien dat een SDF1-3'A mutatie in het SDF-1 gen geassocieerd is met een vertraging in progressie naar AIDS, maar dit wordt weer tegen gesproken door andere studies [11].

## 1.6 Trim5α

Trim5α is een cellulair eiwit dat in staat is HIV-1 replicatie in een vroege stap na entry, maar voor reverse transcriptie te remmen. Trim5α is een eiwit dat behoort tot de ‘tripartite motif family’ (Trim), welke gedefinieerd is door de aanwezigheid van RING, B-box 2 en coiled-coil domeinen. RING domeinen hebben een ubiquitine E3 ligase activiteit wat een beperkende factor voor retrovirussen is omdat ze de afbraak van binnendringende virus eiwitten bevorderen. Het coiled-coil domein is verantwoordelijk voor Trim5 multimerisatie [13]. De Trim eiwitten zijn betrokken bij verschillende cellulaire processen, inclusief cel proliferatie, differentiatie, ontwikkeling, oncogenese en apoptose. Sommige Trim eiwitten hebben antivirale eigenschappen, voornamelijk tegen retrovirussen [14,15]. Trim5α bevat naast het RING, B-box 2 en coiled-coil domein ook het C-terminale B30.2 (SPRY) domein, welke zorgt voor de antivirale activiteit [16]. Ook het B-box 2 domein is essentieel voor een efficiënte restrictie van retrovirussen. In het cytoplasma herkent Trim5α het capsid eiwit van HIV-1 en het B30.2 domein speelt hier waarschijnlijk een belangrijke rol bij. Deze herkenning leidt waarschijnlijk tot degradatie van het virus of verstoort de fase in de replicatie cyclus vlak na entry maar voor reverse transcriptie, het zogenaamde uncoatings proces [16]. Trim5α in rhesus makaak cellen is heel erg effectief en kan HIV-1 infectie compleet remmen. In mensen werkt Trim5α minder goed en kan er ondanks de aanwezigheid van Trim5α nog wel HIV-1 replicatie plaatsvinden. In *in vitro* proeven laat men al snel een remming van HIV-1 replicatie zien van 60-80% [17]. Het zou dus ook kunnen dat Trim5α een rol speelt in *in vivo* en dat Trim5α bijdraagt aan het onder controle houden van virus replicatie.

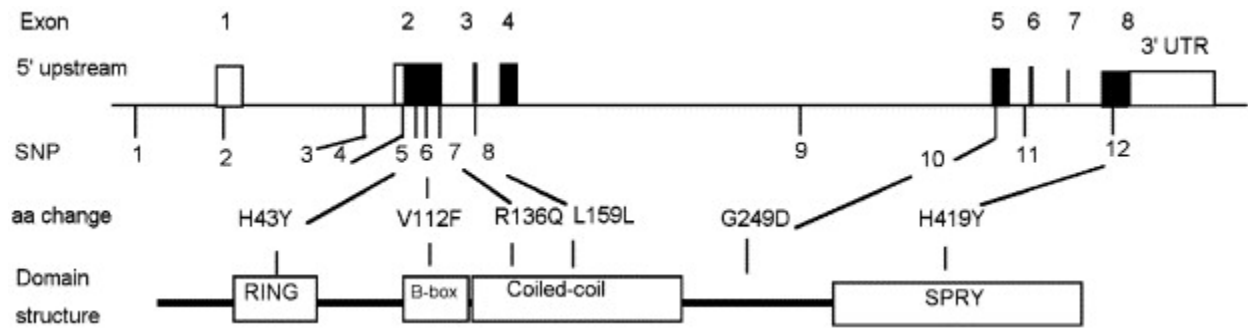
## 1.7 Doel van het onderzoek

In deze studie wordt bestudeerd of Trim5α een bijdrage levert in het onder controle houden van HIV-1 replicatie *in vivo*. Hiervoor wordt het effect van single nucleotide polymorfismen (SNPs) in het Trim5α gen die mogelijk de activiteit van het gen beïnvloeden op het verloop van HIV-1 infectie in de mens bestudeert.

In totaal komen er 5 coding SNPs (mutaties die een verandering in het eiwit veroorzaken) voor in het Trim5α gen: H43Y, V112F, R136Q, G249D en H419Y. Van de H43Y en R136Q SNP is de bepaling voor de patiëntengroepen al opgezet. Het doel is om de bepaling voor de V112F, G249D en H419Y SNP op te zetten en deze 5 SNPs te testen. In figuur 4 zijn de SNP locaties in het humane Trim5 gen weergegeven.

Deze SNPs worden geanalyseerd in 3 groepen: de controle groep (HIV<sup>-</sup>), de HIV<sup>+</sup>-groep en de high risk seronegative (HRSN) groep. De HRSN groep bestaat uit mensen die HIV<sup>-</sup> zijn en van wie bekend is dat ze gedurende een periode van 2 tot 5 jaar hoog risicogedrag hebben vertoond, dus onbeschermd seksuele contacten hebben gehad met een HIV<sup>+</sup> partner. In totaal worden er DNA samples van 104 controles, 170 HIV<sup>+</sup> en 46 HRSN individuen getest.

Het doel van dit project is het screenen van de verschillende patiëntengroepen voor deze SNPs en de allel frequentie tussen de groepen vergelijken. Hiermee wordt de gevoeligheid voor een HIV-1 infectie bepaald. Verder wordt er een analyse uitgevoerd om de invloed van de SNPs op het ziekte verloop te bepalen. Bij deze analyse wordt de tijd in maanden totdat de CD4 cellen voor het eerst onder de 400 cellen per  $\mu$ l zitten, de tijd in maanden totdat de CD4 cellen voor het eerste onder de 200 cellen per  $\mu$ l zitten, het verschil in maanden tussen de tijd dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 400 cellen per  $\mu$ l zitten en dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 200 cellen per  $\mu$ l zitten (CD4 daling), het aantal CD4 cellen op 1,5 en 5 jaar en de virale RNA load op 1,5 en 5 jaar gemeten. Deze waarde worden vergeleken tussen de HIV-1 geïnfecteerde die wel of niet een SNP in Trim5α hebben.



**Figuur 4** SNP locaties in het humane Trim5 gen. De zwarte blokken corresponderen met het Trim5 gen open reading frame, de witte boxen vertegenwoordigen de niet vertaalde gebieden. Het exonen nummer staan erboven. Locaties van de SNPs met nucleotide veranderingen en de corresponderende aminozuur verandering in de eiwit sequenties zijn aangegeven door verticale lijnen [17].

## 2. Materiaal en methode

### 2.1 Monsterverzameling

In deze studie werd er gebruik gemaakt van DNA materiaal afkomstig uit PBMC verkregen uit 3 verschillende groepen mensen. De eerste groep bestaat uit 170 HIV-1 geïnfecteerde homoseksuele mannen die deelnemen aan de Amsterdamse Cohort Studies. De tweede groep bestaat uit 46 HIV-1 negatieve homoseksuele mannen (de HRSN groep) die deelnemen aan de Amsterdamse Cohort studies en die hoog risico gedrag hebben vertoond voor een periode van minimaal 2 tot maximaal 5 jaar. De laatste groep bestaat uit 104 HIV-1 negatieve gezonde bloedbank donoren.

### 2.2 Isolatie van PBMC uit een buffy coat of bloed

PBMC werden uit bloed of buffy coats geïsoleerd. Een buffy coat bevat veel witte bloedcellen en is de fractie die overblijft bij het opwerken van donor bloed nadat de plasma fractie en de rode bloedcel fractie zijn verwijderd. De buffy coat werd 1:5 verdund met PBS/10% TNC oplossing en volbloed werd 1:2 verdund met PBS/10%TNC. In 50 ml buizen werd 12,5 ml Ficoll (Ficoll-Paque <sup>TM</sup> PLUS, GE Healthcare) gepipetteerd. Vervolgens werd de verdunde buffy coat of het verdunde volbloed voorzichtig op de Ficoll gebracht. Dit werd gedaan door de buis met Ficoll zo schuin mogelijk te houden. Dit werd gedurende 20 min op kamertemperatuur, 2000 rpm, zonder rem gecentrifugeerd. De ringfracties die de PBMC bevatten werden in schone 50 ml buizen overgebracht met behulp van een pasteurse pipet. Vervolgens werden de cellen gewassen door deze buizen aan te vullen tot 50 ml met PBS/10% TNC oplossing. Dit werd gecentrifugeerd gedurende 15 min op kamertemperatuur, 1600 rpm, zonder rem. Hierna werd de wasvloeistof afgegoten en werd de pellet geresuspendeerd. Vervolgens werd de buis weer aangevuld tot 50 ml met PBS/10% TNC oplossing. De pellet werd op deze manier nog 3 keer gewassen en er werd gedurende 10 min op kamertemperatuur, 1200 rpm, met rem gecentrifugeerd.

### 2.3 DNA isolatie

DNA werd geïsoleerd uit 1 tot 2 miljoen PBMC. De PBMC werden in een epje gelyseerd in 1 ml L6\*. Vervolgens werd aan de L6 1 ml isopropanol toegevoegd om het DNA uit het cellysaat te precipiteren. Dit werd gecentrifugeerd gedurende 20 min op 14000 rpm. Vervolgens werd het supernatant verwijderd en werd het epje droog gedrukt op een tissue. Het DNA werd daarna 2 maal gewassen met 70% ethanol: er werd hier 1 ml 70% ethanol aan het DNA toegevoegd en dit werd 5 min op 14000 rpm gecentrifugeerd. Het achtergebleven ethanol werd verwijderd door de binnenkant van het epje droog te maken met een wattenstaafje en vervolgens werd het geïsoleerde DNA aan de lucht gedroogd gedurende 15 tot 30 min. Het DNA werd opgelost in 100 µl H<sub>2</sub>O.

\*L6 buffer werd gemaakt door eerst L2 buffer te maken. L2 buffer bevat 0,1 M Tris-HCl, pH 6,4 en 12,1 gr Trisbase (Invitrogen Ultrapure) in 800 ml steriele aquadest. Hier werd 8,1 ml 37% HCl (Merck) aan toegevoegd. Dit werd met steriele aquadest aangevuld tot 1000 ml. L2 wasbuffer bevat 120 gr Guanidine Isothiocynaat (Invitrogen Ultrapure) in 100 ml L2 buffer, dit werd opgelost in een waterbad bij 60°C. 0,2 M EDTA pH 8,0 werd gemaakt door 37,2 gr Titriplex (Na<sub>2</sub>EDTA; Merck) en 4,4 gr NaOH (Merck) op te lossen in een eindvolume van 500 ml met steriele aquadest. De Lysisbuffer (L6) werd gemaakt door aan een hele portie L2 wasbuffer 22 ml 0,2 M EDTA en 2,6 ml Triton X-100 (Sigma) toe te voegen.

## 2.4 PCR

Voor het detecteren van SNPs in het Trim5α gen zijn primers voor een PCR ontworpen (tabel 1). De primers voor de H43Y SNP PCR amplificeren een product van 200 basenparen, de primers voor de V112F SNP PCR amplificeren een product van 526 basenparen, de primers voor de R136Q SNP PCR amplificeren ook een product van 526 basenparen, de primers voor de G249D SNP PCR amplificeren een product van 99 basenparen en de primers voor de H419Y SNP PCR amplificeren een product van 390 basenparen. In tabel 1 staan de primersequenties die gebruikt zijn. Voor de PCR werd een reactiemix gemaakt die bestaat uit de reactie buffer, Taq DNA Polymerase, primers (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> en dNTPs (Promega). Voor de H43Y, V112F, R136Q, G249D en H419Y SNP PCR werd de samenstelling van de reactiemix gebruikt zoals beschreven in tabel 2. Aan de reactiemix voor de PCR van de H43Y, V112F en R136Q SNP werd 2 Unit Taq polymerase toegevoegd in plaats van 1 Unit. Voor de PCR werd 45 µl reactiemix in een PCR strip gepipetteerd en hieraan werd 5 µl DNA toegevoegd. Vervolgens werden de strips in het PCR apparaat geplaatst en werd het gewenste product geamplificeerd tijdens de PCR cycli beschreven in tabel 3. In elke run werd een watercontrole meegenomen als negatieve controle om contaminatie uit te sluiten.

Tabel 1: Primer sequenties  
F = Forward primer; R = Reverse primer

|       |   | Sequentie 5' → 3'                 |
|-------|---|-----------------------------------|
| H43Y  | F | ATG GCT TCT GGA ATC CTG GT        |
|       | R | GGC TGG TAA CTG ATC CGG CAC       |
| V112F | F | ATG GCT TCT GGA ATC CTG GT        |
|       | R | CCC GGG TCT CAG GTC TAT CAT G     |
| R136Q | F | ATG GCT TCT GGA ATC CTG GT        |
|       | R | CCC GGG TCT CAG GTC TAT CAT G     |
| G249D | F | GTG ATG AAG CTT TAT AAG TGA GGA G |
|       | R | CAC ATA CCT TTT TAT GAC GCG ATC C |
| H419Y | F | CTG GGA GGT AGA CGT GTC CAA G     |
|       | R | GAG CAC AGA GTC ATG GGG ACT CCA C |

Tabel 2: Samenstelling PCR mix, 50 µl

|                                      | Eindconcentratie |
|--------------------------------------|------------------|
| PCR Reaction Buffer, 10x             | 1 x              |
| MgCl <sub>2</sub> , 25 mM            | 2 mM             |
| dNTP, 5 mM elk                       | 200 µM elk       |
| Forward primer, 10 µM                | 0.2 µM           |
| Reverse primer, 10 µM                | 0.2 µM           |
| Taq DNA Polymerase Recombinant 5U/µl | 1 U              |
| DNA                                  |                  |

Tabel 3: PCR condities voor de H43Y, V112F, R136Q, G249D en H419Y SNP

| Aantal cycli | H43Y        | V112F<br>R136Q | G249D       | H419Y       |
|--------------|-------------|----------------|-------------|-------------|
| 1x           | 5 min 94°C  | 5 min 95°C     | 5 min 95°C  | 5 min 95°C  |
| 35x          | 30 sec 94°C | 30 sec 95°C    | 30 sec 95°C | 30 sec 95°C |
|              | 30 sec 55°C | 30 sec 50°C    | 30 sec 54°C | 30 sec 52°C |
|              | 75 sec 72°C | 90 sec 68°C    | 30 sec 72°C | 30 sec 72°C |
| 1x           | 10 min 72°C | 10 min 68°C    | 10 min 72°C | 10 min 72°C |
| 1x           | ∞ 4°C       | ∞ 4°C          | ∞ 4°C       | ∞ 4°C       |

## 2.5 Opzuiveren van het PCR product volgens GFX zuivering

Het PCR product werd opgezuiverd volgens de GFX PCR DNA Purification kit van GE Healthcare. Hiervoor werd een GFX kolom in een verzamelbuisje geplaatst. Aan deze kolom werd 500 µl capture buffer (acetaat, chaotrope) toegevoegd. Vervolgens werd het PCR product in de capture buffer gepipetteerd en werd dit 4-6 keer geresuspendeerd. Dit werd vervolgens gedurende 30 sec op 14000 rpm door de kolom gecentrifugeerd om het PCR product aan de kolom te laten binden. De doorloop werd weggegooid en de kolom werd terug in het verzamelbuisje geplaatst. Hier werd 500 µl wasbuffer (Tris-EDTA, ethanol) aan toegevoegd. Ook dit werd door de kolom gecentrifugeerd (30 sec op 14000 rpm). De GFX kolom werd in een steriel 1,5 ml epje geplaatst. Het PCR product werd vervolgens van de kolom geëluëerd door 50 µl H<sub>2</sub>O op de kolom te pipetteren en dit werd 1 min op kamertemperatuur geïncubeerd. Vervolgens werd het DNA geëluëerd door het 1 min op 14000 rpm te centrifugeren. Het opgezuiverde DNA werd bewaard bij -20°C.

## 2.6 Detectie methode van de verschillende SNPs met behulp van restrictie-enzymen

### 2.6.1 Digestie met restrictie-enzymen

De PCR producten van de V112F, R136Q en G249D SNP werden geknipt met restrictie-enzymen van New England Biolabs, (DrdI, FokI) SibEnzyme (BstF5I) en Invitrogen (AvaI). Het PCR product van de V112F SNP werd geknipt met DrdI, het PCR product van de R136Q SNP werd geknipt met AvaI en het PCR product van de G249D SNP werd geknipt met BstF5I of FokI. Voor de V112F SNP werd er een reactiemix gemaakt van 1,25 Unit enzym, 1x buffer (10x NEBuffer 4), H<sub>2</sub>O en 5 µl van het opgezuiverde PCR DNA. Voor de R136Q SNP werd er een reactiemix gemaakt van 1,25 Unit enzym, 1x buffer (10x REact® 2), H<sub>2</sub>O en 5 µl van het opgezuiverde PCR DNA. Voor de G249D SNP met het FokI enzym werd er een reactiemix gemaakt van 3 Unit enzym, 1x buffer (10x NEBuffer 4), H<sub>2</sub>O en 20 µl van het opgezuiverde PCR DNA. Voor de G249D SNP met het BstF5I enzym werd er een reactiemix gemaakt van 2 Unit enzym, 1x buffer (10x SEBuffer Y), H<sub>2</sub>O en 10 µl PCR product. Deze reacties werden 75 min geïncubeerd bij 37°C, alleen de reactie met het BstF5I enzym werd geïncubeerd bij 65°C.

### 2.6.2 Detectie van een SNP met behulp van een agarose gel

Voor de detectie van de V112F en R136Q SNPs werd er een 1% agarose (Invitrogen) gel gemaakt. De agarose werd opgelost in 1x TAE buffer (per 5 liter 50x TAE: 4 liter H<sub>2</sub>O, 1,210 kg tris (Merck), 285,5 ml ijsazijn (Sigma), 186 gr EDTA (titriplex III; Life technologies), pH

8.5) door middel van verwarming in de magnetron en vervolgens werd hier Sybr safe 10.000x (Invitrogen) aan toegevoegd. Dit werd in een geltray met loading kam gegoten. Na een half uur was de gel gestold. De gel werd in een gelbak geplaatst met 1x TAE buffer en werd geladen met een 100 basenparen marker (Invitrogen) en 8 µl PCR samples waaraan 2 µl loading buffer werd toegevoegd. Vervolgens werd de gel gedurende 45 min gerund op 100 Volt. PCR producten en restrictie fragmenten in de gel werden zichtbaar gemaakt met een transilluminator en vervolgens werd er een foto gemaakt.

Voor de detectie van de G249D SNP werd er een 4% agarose gel, een Acryl-Amide gel of een 2% agarose gel gebruikt. Voor de 4% agarose gel werd er 3% low melting point agarose (Invitrogen) en 1% agarose (Invitrogen) dmv verwarming in de magnetron opgelost in 1x TAE buffer. Als de agarose was opgelost, werd er 15 µl ethidiumbromide (Sigma) aan toegevoegd. De gel werd in een gelbak met 1x TAE buffer geplaatst en vervolgens werden de DNA marker en de monsters opgebracht. De gel werd gedurende 3 uur op 100 Volt gerund. PCR en restrictie fragmenten werden zichtbaar gemaakt mbv een transilluminator en er werd een foto van de gel gemaakt. De 2% agarose gel werd op dezelfde manier gemaakt als de 1% agarose gel zoals hierboven beschreven. Deze gel werd 1,5 uur gerund op 100 Volt alvorens er een foto werd gemaakt.

### **2.6.3 Detectie van een SNP met behulp van Acryl-Amide gelen**

Voor de G249D PCR werd er ook gebruik gemaakt van een Acryl-Amide gel voor de detectie van de DNA fragmenten na digestie met restrictie-enzymen. Er werd hier een 13% Acryl-Amide gel gemaakt. Voor deze gel werden 10,8 ml 30% Acryl-Amide/0,8% Bis-Acryl-Amide (National Diagnostics ProtoGel), 11,7 ml H<sub>2</sub>O, 2,5 ml 10x TBE buffer (107,78 g/l Tris; Ultra Pure, 7,44 g/l EDTANa<sub>2</sub> en 55,0 g/l Boric acid; Merck), TEMED (33 µl in 25 ml; Bio-rad) en APS 10% (Bio-Rad) bij elkaar gepipetteerd. TEMED en APS werden als laatste toegevoegd aan de gelmix. De gelmix werd met een 5 ml pipet tussen de glasplaten gepipetteerd. De Acryl-Amide gelen polymeriseren bij kamertemperatuur en na 1,5 uur waren de gelen klaar voor gebruik. De gepolymeriseerde gelen werden in de gelbak geplaatst en de bak werd gevuld met een 1x TBE buffer. De DNA marker en de samples werden op de gel geladen welke vervolgens gerund werd bij 100 Volt gedurende 2,5 uur. Hierna werden de gelen gekleurd met 5 µl ethidiumbromide (Sigma) in een laagje 1x TBE buffer gedurende 30 min. Als laatste werd er een foto gemaakt met de transilluminator om de PCR producten en restrictie fragmenten te visualiseren.

## **2.7 Sequentie reactie**

Voorafgaand aan de sequentie PCR voor de H43Y en H419Y SNP werd eerst een Exosap (Exonuclease I, Shrimp Alkaline Phosphatase, buffer; USB corporation) zuivering uitgevoerd. Exonuclease I verwijdert ongewenste enkelstrengs primers en enkelstrengs DNA, en Shrimp Alkaline Phosphatase verwijdert de overgebleven dNTPs van de PCR reactie. Er werd 5 µl PCR product bij 2 µl exosap gepipetteerd. De exosap reactie werd onder de volgende condities uitgevoerd: 15 min bij 37°C en daarna 15 min bij 80°C. Het exosap product werd gebruikt voor de sequentie PCR.

Voor deze PCR werd de Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit van Applied Biosystems gebruikt. Deze kit bevat BDT (Big Dye Terminator) en BDT-buffer (5x). De BDT mix bestaat uit Big Dye Terminators (dATP, dTTP, dGTP en dUTP), DNA polymerase, magnesium en buffer. Aan 1 µl exosap gezuiverd PCR product werd 1 µl BDT, 3,5 µl BDT-buffer (5x), 1 µl primer (forward of reverse) en 3,5 µl H<sub>2</sub>O toegevoegd. Indien het PCR product op de agarose gel een erg lage intensiteit had, na controle van de PCR, werd er 3 µl exosap gezuiverd PCR product toegevoegd in plaats van 1 µl. Hierdoor werd er 2 µl minder

H<sub>2</sub>O toegevoegd. De sequentie PCR werd onder de volgende condities uitgevoerd: 1 cyclus van 5 min bij 94°C, 30 cycli van 15 sec bij 94°C, 10 sec bij 50°C en 2 min bij 60°C, 1 cyclus van 10 min bij 60°C en vervolgens oneindig bij 4°C.

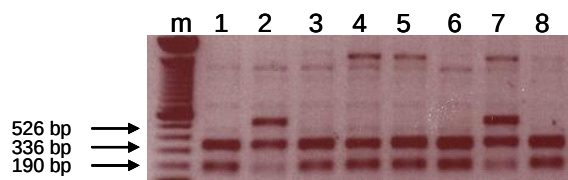
### 3. Resultaten

#### 3.1 Opzetten van de SNP bepalingen

##### 3.1.1 Opzetten van de V112F SNP bepaling

Bij de V112F SNP verandert de nucleotide sequentie van GTC in TTC, hierdoor verandert aminozuur 122 van valine in fenylalanine. Deze mutatie leidt tot het verlies van een *DrdI* restrictie site in het DNA. Om deze SNP aan te tonen werd er een PCR opgezet met primers die een product van 526 basenparen amplificeren. De optimale condities staan beschreven in 'materiaal en methode'. Om de SNP aan te tonen werd er een digestie met *DrdI* uitgevoerd op het PCR product. Als een sample geen SNP bevat en dus alleen Trim5α eiwit tot expressie brengt met een valine op positie 122, wordt het PCR product geknipt door *DrdI* en zijn er twee fragmenten van 336 en 190 basenparen aantoonbaar op gel (figuur 5). Als een sample homozygoot voor de SNP is en er alleen Trim5α met een fenylalanine tot expressie wordt gebracht, wordt het PCR product niet door *DrdI* geknipt en is alleen het 526 basenparen fragment aanwezig. Als een sample heterozygoot is voor de SNP en dus Trim5α met zowel een valine als een fenylalanine tot expressie brengt, wordt maximaal 50% van het PCR product geknipt door *DrdI* en zijn er drie fragmenten van 526, 336 en 190 basenparen zichtbaar op de gel (figuur 5).

In figuur 5 is een bepaling van de V112F SNP weergegeven hier zijn sample 2 en 7 heterozygoot, dit is te zien aan de drie fragmenten van 526, 336 en 190 basenparen. De rest van de samples is homozygoot wildtype, hier zijn alleen het 336 en 190 basenparen fragment te zien.



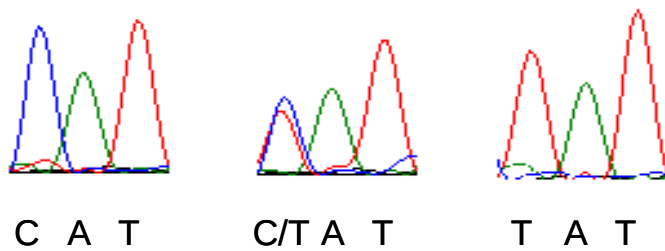
**Figuur 5** Bepaling van de V112F SNP na PCR en digestie met het *DrdI* restrictie-enzym.

m: 100 basenparen marker

Nummer 2 en 7 zijn heterozygoot, hier zijn het 526, 336 en 190 basenparen fragment te zien. De andere samples zijn homozygoot wildtype, hier zijn alleen het 336 en 190 basenparen fragmenten te zien.

##### 3.1.2 Opzetten van de H419Y SNP bepaling

Bij de H419Y SNP verandert de nucleotide sequentie van CAT in TAT, hierdoor verandert aminozuur 419 van histidine in tyrosine. Om deze SNP aan te tonen werd er een PCR opgezet met primers die een product van 390 basenparen amplificeren. De optimale condities staan beschreven in 'materiaal en methode'. Deze mutatie kan niet worden aangetoond met een restrictie site, dus werd de SNP geanalyseerd door middel van een sequentie reactie. Als een sample geen SNP bevat en dus alleen Trim5α eiwit tot expressie brengt met een histidine op positie 419, is er een C piek te zien in de sequentie reactie (figuur 6). Als een sample heterozygoot is voor de SNP en dus Trim5α met zowel een histidine als tyrosine tot expressie wordt gebracht, is er een zowel een C als een T piek te zien in de sequentie reactie (figuur 6). Als een sample homozygoot mutant voor de SNP is wordt er alleen Trim5α met een tyrosine tot expressie gebracht, hierdoor is er een T piek te zien in de sequentie reactie (figuur 6).



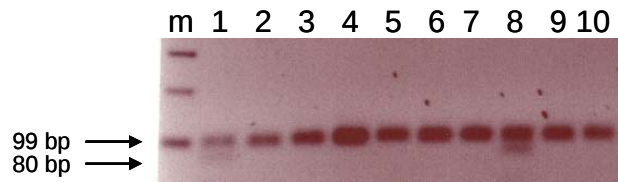
**Figuur 6** Bepaling van de H419Y SNP na PCR en een sequentie reactie. Hier is een gedeelte van het piekenpatroon van een sequentiereactie weergegeven.

Het eerste figuur is van een individu met het 419HH genotype, het tweede figuur is van een individu met het 419HY genotype en het derde figuur is van een individu met het 419YY genotype.

### 3.1.3 Opzetten van de G249D SNP bepaling

Bij de G249D SNP verandert de nucleotide sequentie van GGT in GAT, hierdoor verandert aminozuur 249 van glycine in asparaginezuur. Deze mutatie leidt tot de introductie van een FokI restrictie site in het DNA. Alleen zit er nog een FokI site, 6 nucleotiden verderop. Om deze SNP aan te tonen werd er een PCR opgezet met primers die een product van 310 basenparen amplificeren. Er werd hier een digestie met FokI op het PCR product uitgevoerd. Als een sample geen SNP bevat en alleen Trim5α eiwit tot expressie brengt met een glycine op positie 249, wordt het PCR product een keer geknipt door FokI en is er een product van 214 en 96 basenparen zichtbaar op gel. Als een sample wel een SNP bevat en Trim5α asparaginezuur op positie 249 tot expressie brengt, dan wordt het PCR product twee keer geknipt door FokI en is er een product van 214, 90 en 6 basenparen zichtbaar op gel. Als een sample heterozygoot is voor een SNP en Trim5α met zowel glycine als asparaginezuur tot expressie komen wordt het product dubbel en enkel geknipt door FokI en zijn er vier fragmenten van 212, 96, 90 en 6 basenparen zichtbaar op gel. Zowel met een 4% agarose gel als met een Acryl-Amide gel kon het verschil tussen het 96 en 90 basenparen fragment niet goed worden aangetoond. Het fragment van 6 basenparen kan niet worden aangetoond omdat dit te klein is. Ook met een ander restrictie-enzym, BstF5I, met dezelfde restrictie site's, kon de SNP niet worden aangetoond.

Vervolgens werd een nieuwe reverse primer ontworpen over de tweede FokI/BstF5I restrictie site. In deze primer werd een mutatie aangebracht om de restrictie site te verwijderen. Met de nieuwe primer set werd een PCR opgezet die een product van 99 basenparen amplificeren. De optimale condities staan beschreven in 'materiaal en methode'. Als een sample geen SNP bevat en alleen Trim5α eiwit tot expressie brengt met een glycine op positie 249, wordt het PCR product niet geknipt door BstF5I en is er een product van 99 basenparen zichtbaar op gel (figuur 7). Als een sample wel een SNP bevat en Trim5α asparaginezuur op positie 249 tot expressie brengt, dan wordt het PCR product een keer geknipt door BstF5I en is er een product van 80 en 19 basenparen zichtbaar op gel. Als een sample heterozygoot is voor een SNP en Trim5α met zowel glycine als asparaginezuur tot expressie brengt, wordt maximaal 50% van het PCR product geknipt door BstF5I en zijn er drie fragmenten van 99, 80 en 19 basenparen zichtbaar op gel (figuur 7). Voor deze SNP zijn alleen het 99 en 80 basenparen fragment aantoonbaar op de agarose gel, het 19 basenparen fragment is te klein om te visualiseren.



**Figuur 7:** Bepaling van de G249D SNP na PCR en digestie met het BstF5I restrictie-enzym.

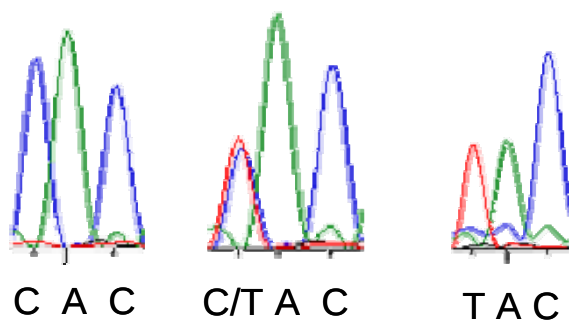
m: 100 basenparen marker

Nummer 1 en 8 zijn heterozygoot, hier zijn het 99 en 80 basenparen fragment te zien. De andere samples zijn homozygoot wildtype, hier is alleen het 99 basenparen fragment te zien.

### 3.1.4 Bepaling van de H43Y en R136Q SNP

De PCR's voor het bepalen van de H43Y en R136Q SNP waren reeds opgezet.

Bij de H43Y SNP verandert de nucleotide sequentie van CAC in TAC, hierdoor verandert aminozuur 43 van histidine in tyrosine. Deze mutatie kan niet worden aangetoond met een restrictie site, dus werd de SNP geanalyseerd door middel van een sequentie reactie. Om deze SNP aan te tonen werd er een PCR opgezet met primers die een product van 200 basenparen amplificeren. Als een sample geen SNP bevat en dus alleen Trim5α eiwit tot expressie brengt met een histidine op positie 43, is er een C piek te zien in de sequentie reactie (figuur 8). Als een sample heterozygoot is voor de SNP en dus Trim5α met zowel een histidine als tyrosine tot expressie wordt gebracht, is er een zowel een C als een T piek te zien in de sequentie reactie (figuur 8). Als een sample homozygoot mutant voor de SNP is wordt er alleen Trim5α met een tyrosine tot expressie gebracht, hierdoor is er een T piek te zien in de sequentie reactie (figuur 8).

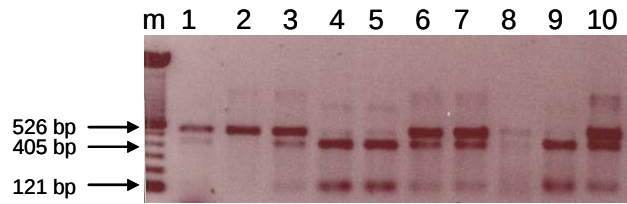


**Figuur 8** Bepaling van de H43Y SNP na PCR en een sequentie reactie. Hier is een gedeelte van het piekenpatroon van een sequentiereactie weergegeven.

Het eerste figuur is van een individu met het 43HH genotype, het tweede figuur is van een individu met het 43HY genotype en het derde figuur is van een individu met het 43YY genotype.

Bij de R136Q SNP verandert de nucleotide sequentie van CGG in CAG, hierdoor verandert aminozuur 136 van arginine in glutamine. Deze mutatie leidt tot het verlies van de Aval restrictie site. Om deze SNP aan te tonen werd er een PCR opgezet met primers die een product van 526 basenparen amplificeren. Als een sample geen SNP bevat en dus alleen Trim5α eiwit tot expressie brengt met een arginine op positie 136, wordt het PCR product geknipt door Aval en zijn er twee fragmenten van 405 en 121 basenparen aantoonbaar op gel (figuur 9). Als een sample homozygoot voor de SNP is en er alleen Trim5α met een glutamine tot expressie wordt gebracht, wordt het PCR product niet door Aval geknipt en is alleen het 526 basenparen fragment aanwezig (figuur 9). Als een sample heterozygoot is voor de SNP en dus Trim5α met zowel een arginine als een glutamine tot expressie brengt, wordt maximaal

50% van het PCR product geknipt door *Ava*I en zijn er drie fragmenten van 526, 405 en 121 basenparen zichtbaar op gel (figuur 9).



**Figuur 9:** Bepaling van de R136Q SNP na PCR en digestie met het *Ava*I restrictie-enzym.

m: 100 basenparen marker.

Nummer 4,5 en 9 zijn homozygoot wildtype (136RR), hier is het 405 en 121 basenparenfragment te zien. Nummer 1,3,6,7,8 en 10 zijn heterozygoot (136RQ), hier zijn het 526,405 en 121 basenparen fragment te zien. Nummer 2 is homozygoot mutant (136QQ), hier is alleen het 526 basenparen fragment te zien.

### 3.2 SNP frequentie in relatie tot de gevoeligheid van een HIV-1 infectie

In deze studie werd er gekeken naar de frequentie van de SNP en de relatie tot de gevoeligheid voor HIV-1 infectie. Om dit te kunnen testen werd de aanwezigheid van de verschillende SNPs in het Trim5α gen in drie verschillende groepen geanalyseerd en met elkaar vergeleken. De 3 verschillende groepen bestaan uit 104 HIV-1 negatieve controles, 170 HIV-1 geïnfecteerde individuen en 46 HRSN individuen. DNA geïsoleerd uit PBMC afkomstig van de individuen uit de verschillende groepen zijn geanalyseerd op aanwezigheid van SNPs in het Trim5α gen. Vervolgens werd de genotype en allel frequentie bepaald en dit werd vergeleken tussen de verschillende groepen.

#### 3.2.1 Frequentie analyse voor de H43Y SNP

Van de 104 HIV-1 negatieve controle individuen werden er voor de H43Y SNP 82 individuen gevonden met alleen een H op positie 43, 22 individuen met zowel een H als een Y op positie 43 en geen individuen met alleen een Y op positie 43. Het percentage HY op positie 43 in deze groep is 21,2%. De allel frequentie is hier 0,106 (tabel 1). Van de 170 HIV-1 geïnfecteerde individuen werden er 137 individuen gevonden met alleen een H op positie 43, 27 individuen met zowel een H als een Y op positie 43 en 3 individuen met alleen een Y op positie 43. Het percentage individuen met alleen een Y of een H en een Y op positie 43 is 18,0% en de allel frequentie is 0,099 (tabel 1). Van de 46 HRSN individuen werden er 31 individuen gevonden met alleen een H op positie 43, 13 individuen met zowel een H als een Y op positie 43 en 1 individu met alleen een Y op positie 43. Het percentage individuen met alleen een Y of een H en een Y op positie 43 is 31,1% en de allel frequentie is 0,167 (tabel 1). De allel en genotype frequenties tussen de drie groepen werden vergeleken en er werden geen significante verschillen tussen de HIV-1 negatieve controle individuen en de HIV-1 geïnfecteerde individuen gevonden (figuur 10). In de HRSN individuen werd een verhoging aantreffen van het 43HY/43YY genotype en allel frequentie ten opzichte van de HIV-1 geïnfecteerde individuen, maar deze verschillen zijn niet significant (figuur 10).

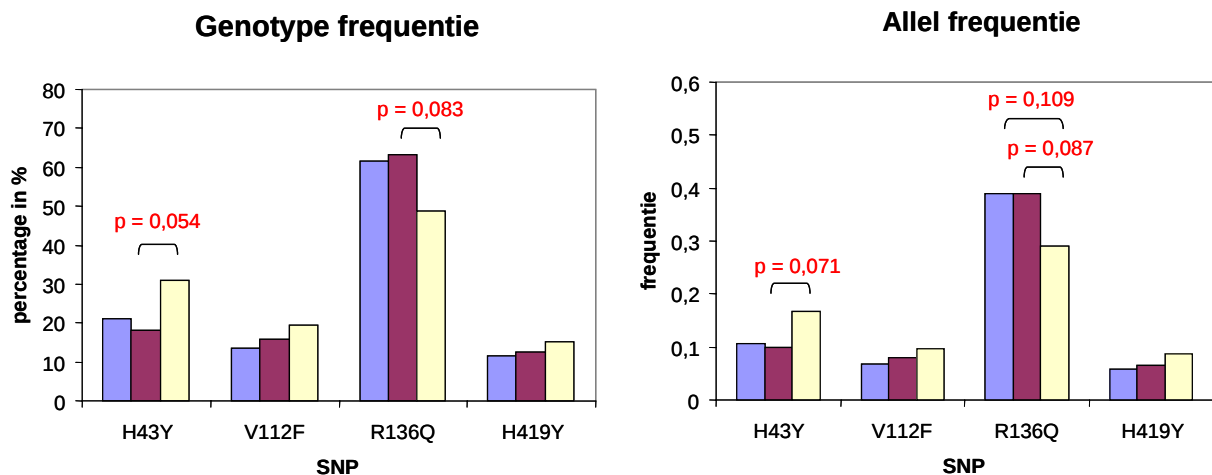
#### 3.2.2 Frequentie analyse voor de V112F SNP

Van de 104 HIV-1 negatieve controle individuen werden er voor de V112F SNP 90 individuen gevonden met alleen een V op positie 112, 14 individuen met zowel een V als een F op positie 112 en geen individuen met alleen een F op positie 112. Hier is de genotype frequentie van een F op positie 112 13,5% en de allel frequentie is 0,067 (tabel 1). Van de 170

HIV-1 geïnfecteerde individuen werden er 138 individuen gevonden met alleen een V op positie 112, 26 individuen met zowel een V als een F op positie 112 en geen individuen met alleen een F op positie 112. In deze HIV-1 geïnfecteerde groep is de genotype frequentie van een F op positie 112 15,9% en de allel frequentie is 0,079 (tabel 1). In de HRSN groep van 46 individuen werden er 37 individuen gevonden met alleen een V op positie 112, 9 individuen met zowel een V als een F op positie 112 en geen individuen met alleen een F op positie 112. Hier is de genotype frequentie van een F op positie 112 19,6% en de allel frequentie is 0,098 (tabel 1). De allel en genotype frequentie tussen de drie groepen werd vergeleken en er werden geen significante verschillen gevonden tussen de HIV-1 negatieve controle individuen, de HIV-1 geïnfecteerde individuen en de HRSN individuen (figuur 10).

**Tabel 1** Verdeling van de H43Y en V112F SNP in de HIV-1 negatieve controle individuen, HIV-1 geïnfecteerde individuen en de HRSN individuen. Hier is het aantal en het percentage in de gehele groep weergegeven.

|        | H43Y         |                  |              | V112F        |                  |              |
|--------|--------------|------------------|--------------|--------------|------------------|--------------|
|        | Controle     | HIV <sup>+</sup> | HRSN         | Controle     | HIV <sup>+</sup> | HRSN         |
| HH/VV  | 78.8% (n=82) | 82.0% (n=137)    | 68.9% (n=31) | 86.5% (n=90) | 84.1% (n=138)    | 80.4% (n=37) |
| HY/VF  | 21.2% (n=22) | 16.2% (n=27)     | 28.9% (n=13) | 13.5% (n=14) | 15.9% (n=26)     | 19.6% (n=9)  |
| YY/FF  | - (n=0)      | 1.8% (n=3)       | 2.2% (n=1)   | - (n=0)      | - (n=0)          | - (n=0)      |
| totaal | 104          | 167              | 45           | 104          | 164              | 46           |



**Figuur 10** De genotype frequentie en de allel frequentie van de H43Y, V112F, R136Q en H419Y SNPs in de HIV-1 negatieve controle individuen, HIV-1 geïnfecteerde individuen en HRSN individuen.

De test is uitgevoerd met de 2-sided Pearson Chi-Square. p = significantie.

Blauw is de HIV-1 negatieve controle groep, paars de HIV-1 geïnfecteerde groep en geel de HRSN groep.

### 3.2.3 Frequentie analyse voor de R136Q SNP

Van de 104 HIV-1 negatieve controle individuen werden er voor de R136Q SNP 40 individuen gevonden met alleen een R op positie 136, 47 individuen met zowel een R als een Q op positie 136 en 17 individuen met alleen een Q op positie 136. De genotype frequentie voor een Q op positie 136 is 61,5% en de allel frequentie is 0.389 (tabel 2). Van de 170 HIV-1 geïnfecteerde individuen werden er 62 individuen gevonden met alleen een R op positie 136, 82 individuen met zowel een Q als een R op positie 136 en 25 individuen hadden alleen een Q op positie 136. De genotype frequentie van een Q op positie 136 is 63,3% en de allel frequentie is 0,391 (tabel 2). Van de 46 HRSN individuen werden er 22 individuen met alleen een R op positie 136, 17 individuen met zowel een R als een Q op positie 136 en 4 individuen met alleen een Q op positie 136 gevonden. Hier is de genotype frequentie van een Q op

positie 136 48,8% en de allel frequentie is 0,291 (tabel 2). De allel en genotype frequentie tussen de drie groepen werd vergeleken en er werd geen significant verschil gevonden tussen de HIV-1 negatieve controles en de HIV-1 geïnfecteerde individuen (figuur 10). In de HRSN individuen werd een verlaging aangetroffen van het 136QQ/136RQ genotype en allel frequentie ten opzichte van de HIV-1 geïnfecteerde individuen (figuur 10). Ditzelfde is ook te zien in de allel frequentie tussen de HIV-1 negatieve controles en de HRSN individuen (figuur 10). Deze verschillen zijn echter niet significant.

### 3.2.4 Frequentie analyse voor de H419Y SNP

Van de 104 HIV-1 negatieve controle individuen voor de H419Y SNP werden er 92 individuen met alleen een H op positie 419, 12 individuen met zowel een H als een Y op positie 419 en geen individuen met alleen een Y op positie 419 gevonden. De genotype frequentie van een Y op positie 419 is 11,5% en de allel frequentie is 0,058 (tabel 2). Van de 170 HIV-1 geïnfecteerde individuen werden er 145 individuen gevonden met alleen een H op positie 419, 20 individuen met zowel een H als een Y op positie 419 en 1 individu met alleen een Y op positie 419. De genotype frequentie van de groep met een Y op positie 419 is 12,7% en de allel frequentie is 0,066 (tabel 2). Van de 46 HRSN individuen werden er 39 individuen gevonden met alleen een H op positie 419, 6 individuen met zowel een H als een Y op positie 419 en 1 individu met alleen een Y op positie 419. De genotype frequentie van een Y op positie 419 is hier 15,2% en de allel frequentie is 0,087 (tabel 2). Ook voor deze SNP werd er geen verschil gevonden tussen de HIV-1 negatieve controles, HIV-1 geïnfecteerde individuen en de HRSN individuen in de genotype en allel frequentie (figuur 10).

**Tabel 2** Verdeling van de R136Q en H419Y SNP in de HIV-1 negatieve controle individuen, HIV-1 geïnfecteerde individuen en de HRSN individuen. Hier is het aantal en het percentage in de gehele groep weergegeven.

|        | R136Q        |                  |              | H419Y        |                  |              |
|--------|--------------|------------------|--------------|--------------|------------------|--------------|
|        | Controle     | HIV <sup>+</sup> | HRSN         | Controle     | HIV <sup>+</sup> | HRSN         |
| RR/HH  | 38.5% (n=40) | 36.7% (n=62)     | 51.2% (n=22) | 88.5% (n=92) | 87.3% (n=145)    | 84.8% (n=39) |
| RQ/HY  | 45.2% (n=47) | 48.5% (n=82)     | 39.5% (n=17) | 11.5% (n=12) | 12.0% (n=20)     | 13.0% (n=6)  |
| QQ/YY  | 16.3% (n=17) | 14.8% (n=25)     | 9.3% (n=4)   | - (n=0)      | 0.6% (n=1)       | 2.2% (n=1)   |
| totaal | 104          | 169              | 43           | 104          | 166              | 46           |

### 3.3 De invloed van de SNP op het verloop van een HIV-1 infectie

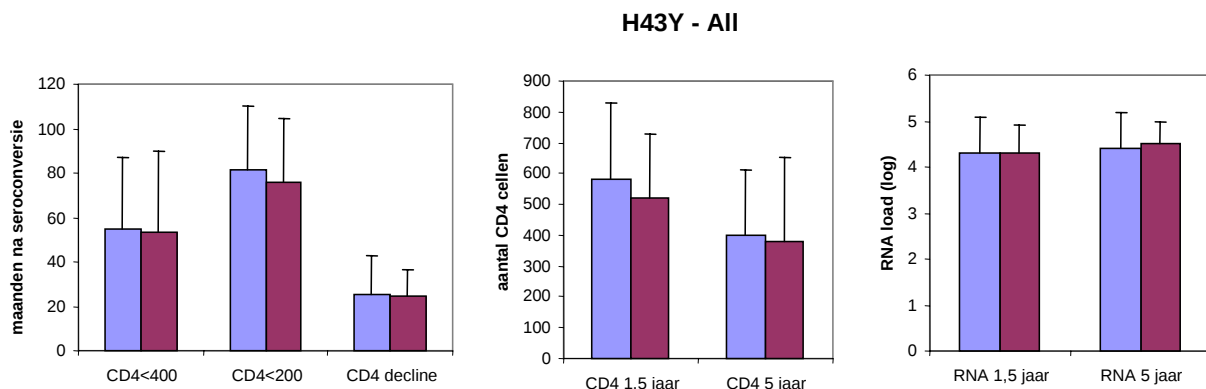
Vervolgens werd er een analyse uitgevoerd om de invloed van een SNP in het Trim5α gen op het verloop van HIV-1 infectie te bestuderen. Er werd bestudeerd of een SNP in Trim5α invloed heeft op verschillende parameters. Ten eerste werd er gekeken naar de tijd van seroconversie tot het moment dat het aantal CD4 cellen beneden de 400 cellen per µl zijn gedaald (CD4<400). Ten tweede werd er gekeken naar de tijd van seroconversie tot het moment dat het aantal CD4 cellen beneden de 200 cellen per µl zijn gedaald (CD4<200). Ten derde werd er gekeken naar de tijd tussen het moment dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 400 cellen per µl zijn gedaald tot aan het moment dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 200 cellen per µl zijn gedaald (CD4 daling). Ten vierde werd er gekeken naar het aantal CD4 cellen op setpoint (1,5 jaar na seroconversie na acute infectie). Ten vijfde werd er gekeken naar het aantal CD4 cellen op 5 jaar na seroconversie. En als laatste werd er gekeken naar de virale RNA load op setpoint en 5 jaar na seroconversie. De tijd van seroconversie tot het moment dat de CD4 cellen beneden de 400 cellen per µl zijn gedaald geeft de periode weer waarin de HIV-1 geïnfecteerde persoon hoge CD4 aantallen heeft en de

asymptomatische fase doormaakt. Als de CD4 aantallen verder dalen vindt er progressie plaats tot AIDS. Een AIDS diagnose wordt onder andere bij een CD4 aantal beneden de 200 cellen per  $\mu\text{l}$  gegeven. Er werd naar de invloed van de SNP gekeken op deze parameters in de totale groep HIV-1 geïnfecteerde mensen, R5 en X4 progressors. R5 progressors zijn mensen die tijdens de hele infectie periode alleen CCR5 gebruikende HIV-1 virussen hebben. X4 progressors zijn mensen die tijdens het verloop van infectie HIV-1 varianten ontwikkelen die een andere co-receptor namelijk CXCR4 kunnen gebruiken. Ongeveer 50% van de HIV-1 geïnfecteerde individuen ontwikkelt CXCR4 gebruikende varianten tijdens het verloop van de infectie en het ontwikkelen van CXCR4 varianten is geassocieerd met een versnelde progressie naar AIDS.

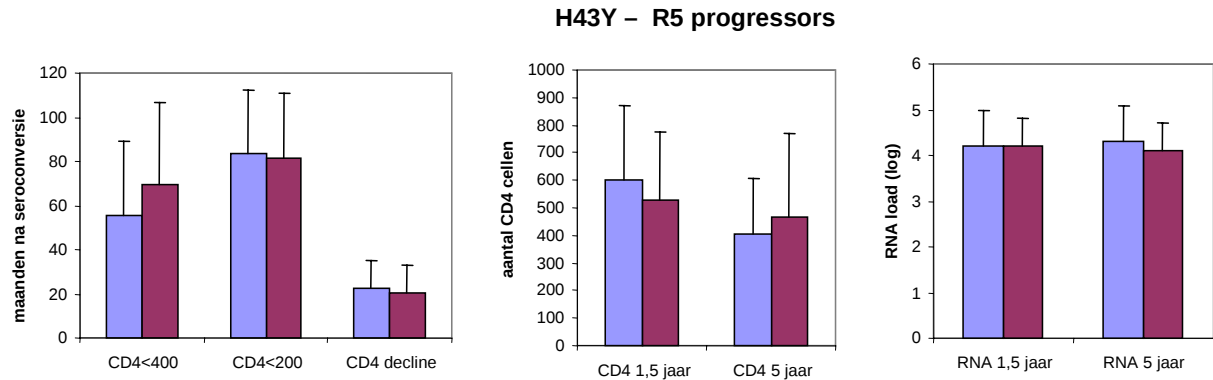
### 3.3.1 De invloed van de H43Y SNP op ziekte progressie

Als eerste werd er gekeken naar het effect van de H43Y SNP op het ziekte verloop. In deze analyse werd er geen onderscheid gemaakt tussen individuen met het 43HY en 43YY genotype omdat het aantal gevonden individuen met het 43YY genotype te klein is voor een aparte analyse. In de totale groep HIV-1 geïnfecteerde individuen werd er geen effect van de H43Y SNP op het ziekte verloop (tijd tot CD4<400 en CD4<200, CD4 daling) gevonden (figuur 11A). Ook werden er geen verschillen tussen individuen met of zonder de SNP in het aantal CD4 cellen en de virale RNA load op setpoint en 5 jaar gevonden (figuur 11A). Wanneer de R5 en X4 progressors apart geanalyseerd werden, werd er ook in de R5 progressors geen effect van de H43Y SNP op het ziekte verloop gevonden (figuur 11B). In de X4 progressors (figuur 11C) werden er wel verschillen in ziekte verloop gevonden. X4 progressors met een H43Y SNP bereiken eerder CD4 aantallen beneden de 400 cellen per  $\mu\text{l}$  ( $p = 0,025$ ), maar er is geen significant verschil gevonden in de tijd totdat de CD4 aantallen beneden de 200 cellen per  $\mu\text{l}$  kwamen. Ook werd er geen verschil gevonden in de tijd tussen het moment dat de CD4 aantallen voor het eerst beneden de 400 cellen per  $\mu\text{l}$  kwamen en het moment dat de CD4 aantallen voor het eerst beneden de 200 cellen per  $\mu\text{l}$  kwamen (CD4 daling; figuur 11C). Ook is te zien dat het aantal CD4 cellen in het bloed op 5 jaar na seroconversie lager is in de X4-progressors met de H43Y SNP dan in de X4 progressors zonder deze SNP, maar dit is net niet significant ( $p = 0,068$ ).

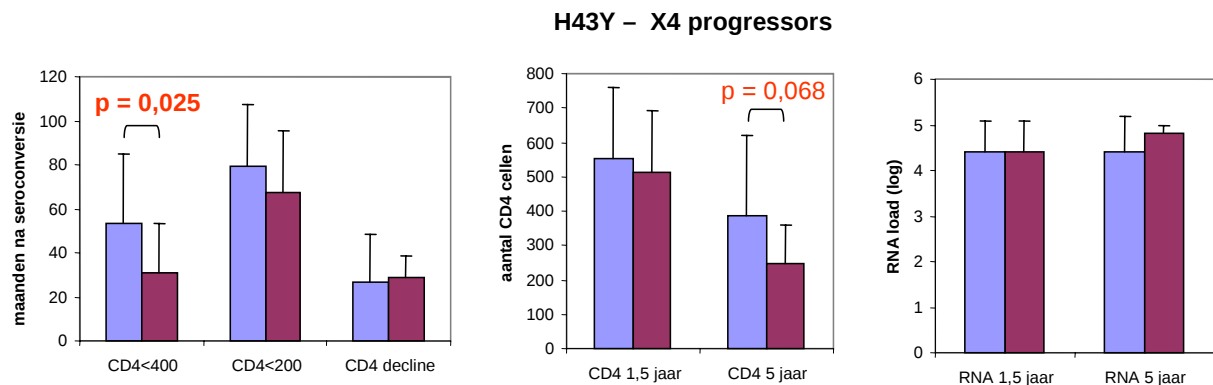
A



B



C



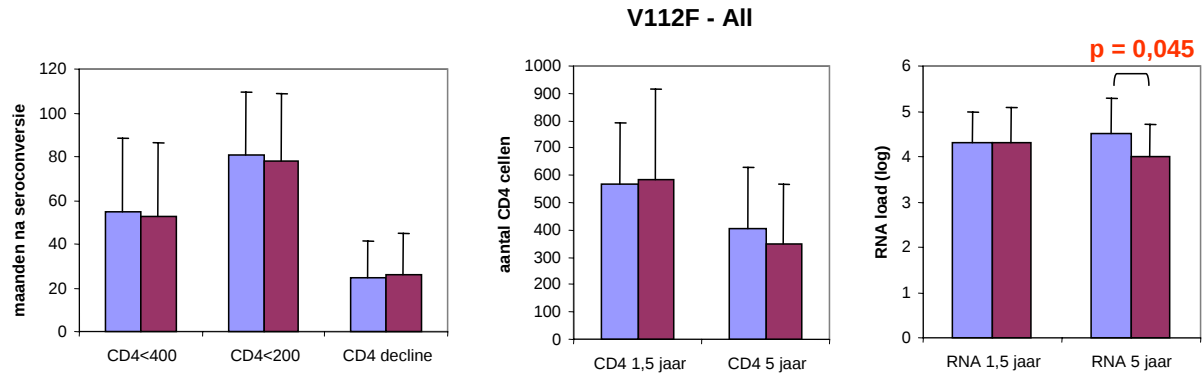
**Figuur 11** Grafieken van de H43Y SNP in de HIV-1 geïnfecteerde groep voor de individuen met het 43HH genotype en de individuen met het 43HY/43YY genotype. Hier is het aantal maanden na seroconversie tot het moment dat het aantal CD4 cellen beneden de 400 per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4<400), de tijd van seroconversie tot het moment dat het aantal CD4 cellen beneden de 200 per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4<200) en de tijd tussen het moment dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 400 per  $\mu$ l zijn gedaald tot aan het moment dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 200 cellen per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4 daling) weergegeven. Ook is het aantal CD4 cellen en RNA load (log) op setpoint (1,5 jaar na seroconversie) en 5 jaar na seroconversie weergegeven. (A) H43Y SNP in de totale HIV-1 geïnfecteerde groep. (B) H43Y SNP in de R5 progressors. (C) H43Y SNP in de X4 progressors.

Blauw zijn de individuen met het 43HH genotype, paars zijn de individuen met het 43HY of 43YY genotype. p is de significante waarde.

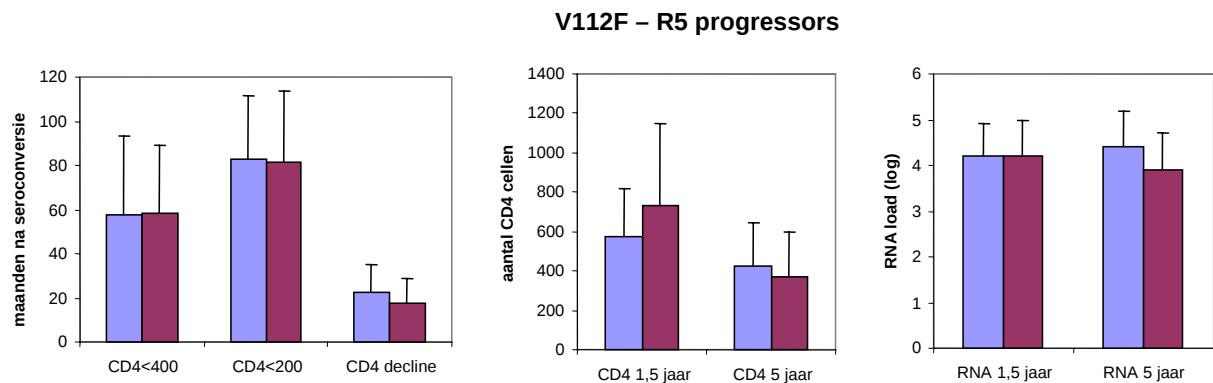
### 3.3.2 De invloed van de V112F SNP op ziekte progressie

Ook hier werd gekeken naar het effect van de V112F SNP op het ziekte verloop. Voor deze analyse werd er geen onderscheid gemaakt tussen het 112VF en 112FF genotype, omdat er geen individuen gevonden zijn met het 112FF genotype. In de totale groep HIV-1 geïnfecteerde individuen werd er geen effect van de V112F SNP op het ziekte verloop gevonden (tijd tot CD4<400 en CD4<200, CD4 daling; figuur 12A). Ook werden er geen verschillen gevonden tussen individuen met of zonder SNP in het aantal CD4 cellen op setpoint en 5 jaar, maar wel in de virale RNA load op 5 jaar (figuur 12A). Individuen met de V112F SNP hebben hier een lagere virale load ( $p = 0,045$ ). Wanneer de R5 en X4 progressors apart geanalyseerd werden, werd er geen verschil tussen individuen met of zonder SNP op het verloop van de ziekte (CD4<400, CD4<200 en CD4 daling), CD4 aantallen en RNA load gevonden (figuur 12B en 12C).

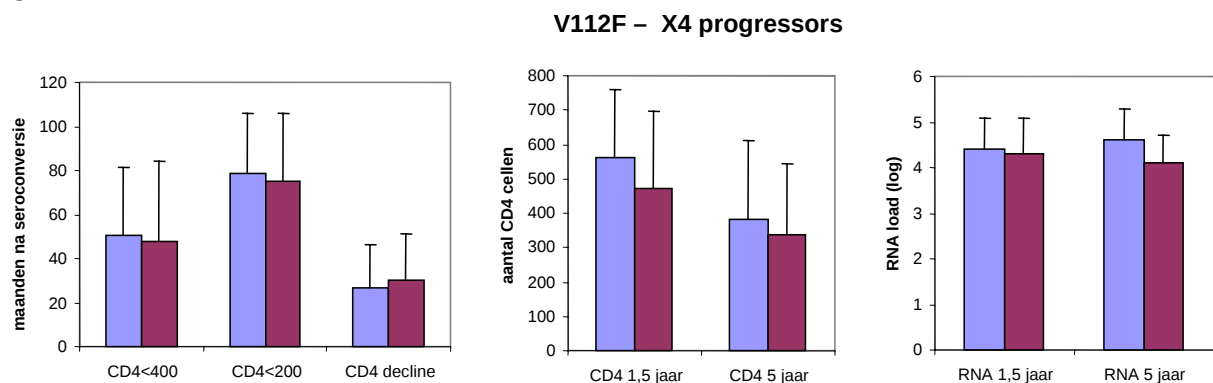
A



B



C



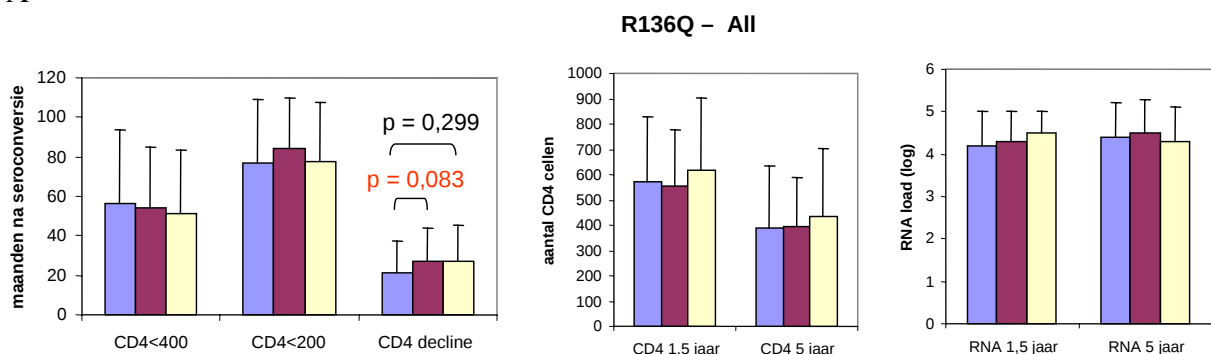
**Figuur 12** Grafieken van de V112F SNP in de HIV-1 geïnfecteerde groep voor de individuen met het 112VV genotype en de individuen met het 112VF genotype. Hier is het aantal maanden na seroconversie tot het moment dat het aantal CD4 cellen beneden de 400 per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4<400), de tijd van seroconversie tot het moment dat het aantal CD4 cellen beneden de 200 per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4<200) en de tijd tussen het moment dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 400 per  $\mu$ l zijn gedaald tot aan het moment dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 200 cellen per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4 daling) weergegeven. Ook is het aantal CD4 cellen en RNA load (log) op setpoint (1,5 jaar na seroconversie) en 5 jaar na seroconversie weergegeven. (A) V112F SNP in de totale HIV-1 geïnfecteerde groep. (B) V112F SNP in de R5 progressors. (C) V112F SNP in de X4 progressors. Blauw zijn de individuen met het 112VV genotype, paars zijn de individuen met het 112VF genotype. p is de significante waarde.

### 3.3.3 De invloed van de R136Q SNP op ziekte progressie

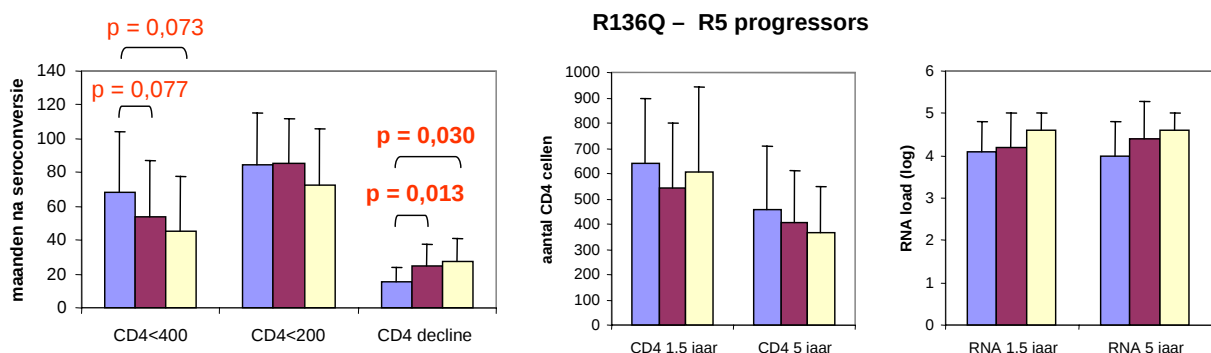
Ook voor de R136Q SNP werd er gekeken naar het effect van de SNP op het ziekte verloop. Deze SNP komt in een redelijk hoge frequentie voor onder de bevolking (grafiek 7), waardoor er voldoende individuen met het 136QQ genotype waren om deze als aparte groep te analyseren. Deze beide groepen (136RQ en 136QQ) werden met het 136RR genotype vergeleken, maar niet met elkaar. In de totale groep HIV-1 geïnfecteerde werden er geen

significante verschillen gevonden in het ziekte verloop (CD4<400, CD4<200, CD4 daling; figuur 13A) tussen individuen die homozygoot of heterozygoot zijn voor de R136Q SNP ten opzichte van de individuen die een R op positie 136 van het Trim5α gen hebben. Verder zijn er geen verschillen gevonden tussen individuen met of zonder de SNP in de totale groep in de CD4 aantallen en de virale RNA load op 1,5 en 5 jaar na seroconversie. In de R5 progressors werd er een sneller verloop van de infectie tijdens de eerste fase van de infectie gevonden en bereiken de CD4 aantallen eerder een waarde onder de 400 cellen per  $\mu\text{l}$  in individuen die het 136RQ en het 136QQ genotype bezitten ten opzichte van individuen met het 136RR genotype (figuur 13B), maar dit is net niet significant. Er werd geen verschil gevonden tussen de verschillende genotypen in de tijd van seroconversie tot het moment dat de CD4 cellen beneden de 200 cellen per  $\mu\text{l}$  zijn gedaald (CD4<200), dit komt doordat het aantal CD4 cellen significant langzamer daalt (CD4 daling) in de 136RQ individuen ( $p = 0,013$ ) en in de 136QQ individuen ( $p = 0,030$ ) ten opzichte van de 136RR individuen (figuur 13B). Het aantal CD4 cellen en de virale RNA load op setpoint en 5 jaar zijn niet verschillend in de R5 progressors (figuur 13B). In de X4 progressors werd er gevonden dat bij individuen met het 136RQ en het 136QQ genotype de tijd van seroconversie tot het moment dat de CD4 cellen beneden de 400 cellen per  $\mu\text{l}$  zijn gedaald langer is in vergelijking met individuen met het 136RR genotype, maar dit is niet significant (figuur 13C). Ook werd er gevonden dat individuen met de R136Q SNP er langer over doen om CD4 aantallen beneden de 200 cellen per  $\mu\text{l}$  te bereiken. Dit verschil is significant voor individuen met het 136RQ genotype ( $p = 0,022$ ; figuur 13C). Ook werd er gevonden dat het aantal CD4 cellen op 1,5 en 5 jaar na seroconversie hoger is ten opzichte van individuen die het 136RR genotype hebben (figuur 13C). Vooral individuen met het 136QQ genotype hebben significant hogere CD4 aantallen op 5 jaar na seroconversie ( $p = 0,037$ ). De virale RNA load op 5 jaar is lager in individuen met de R136Q SNP en dit verschil is significant voor het 136QQ genotype ( $p = 0,036$ ; figuur 13C).

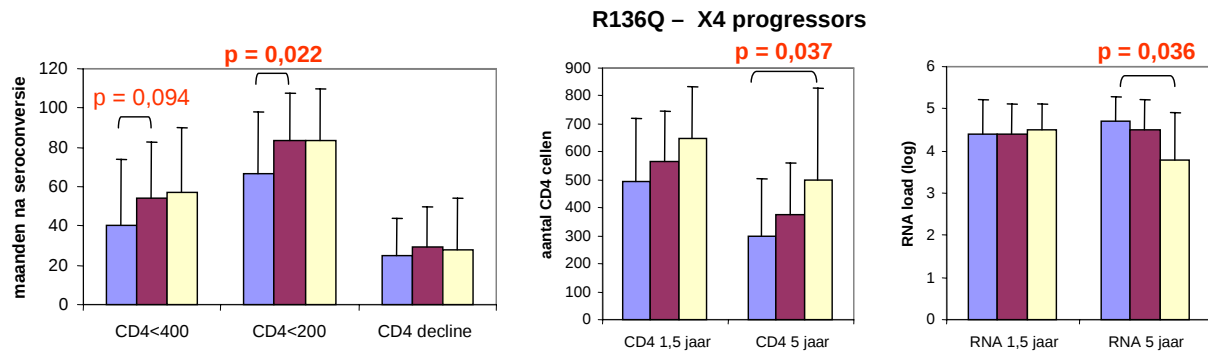
A



B



C



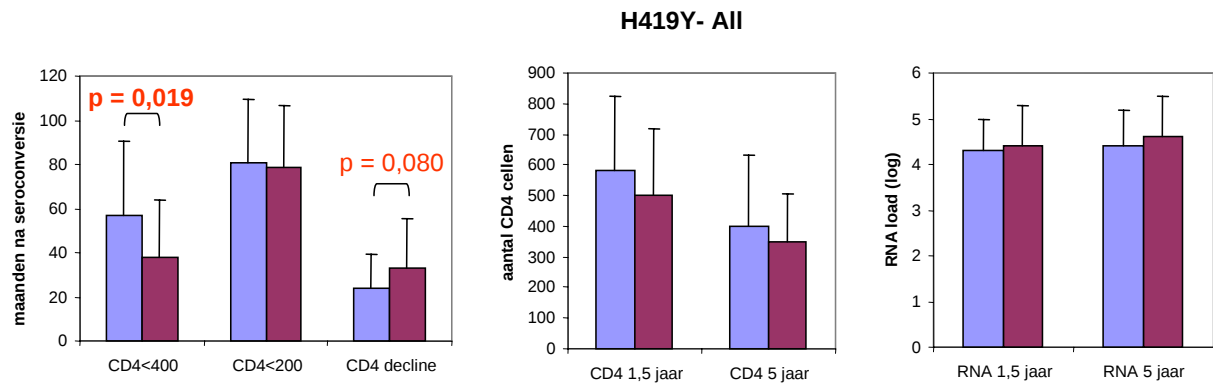
**Figuur 13** Grafieken van de R136Q SNP in de HIV-1 geïnfecteerde groep voor de individuen met het 136RR, 136RQ en 136QQ genotype. Hier is het aantal maanden na seroconversie tot het moment dat het aantal CD4 cellen beneden de 400 per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4<400), de tijd van seroconversie tot het moment dat het aantal CD4 cellen beneden de 200 per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4<200) en de tijd tussen het moment dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 400 per  $\mu$ l zijn gedaald tot aan het moment dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 200 cellen per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4 daling) weergegeven. Ook is het aantal CD4 cellen en RNA load (log) op setpoint (1,5 jaar na seroconversie) en 5 jaar na seroconversie weergegeven. (A) R136Q SNP in de totale HIV-1 geïnfecteerde groep. (B) R136Q SNP in de R5 progressors. (C) R136Q SNP in de X4 progressors.

Blauw zijn de individuen met het 136RR genotype, paars zijn de individuen met het 136RQ genotype en geel zijn de individuen met het 136QQ genotype. p is de significante waarde.

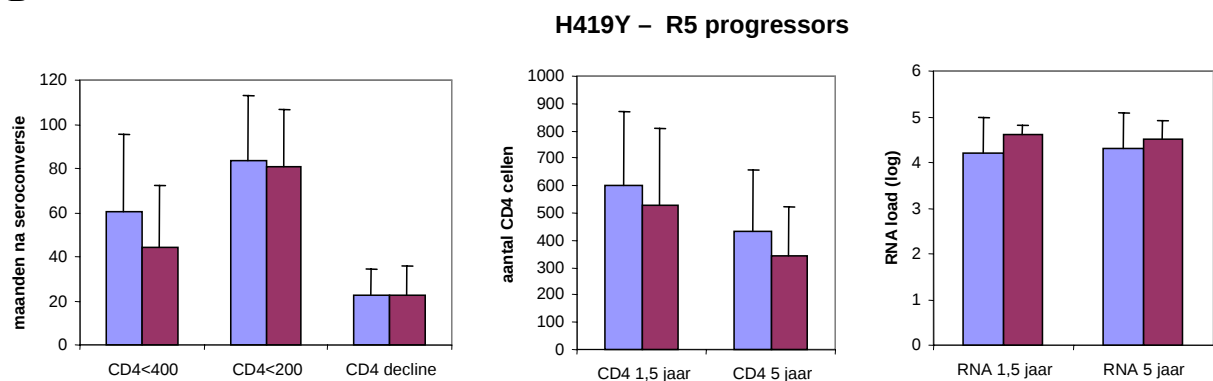
### 3.3.4 De invloed van de H419Y SNP op ziekte progressie

Als laatste werd er naar het effect van de H419Y SNP op het ziekte verloop gekeken. Ook voor deze SNP werden er te weinig individuen met het 419YY genotype gevonden voor een aparte analyse. In de totale groep bereiken individuen met het 419HY/419YY genotype eerder CD4 aantallen onder de 400 cellen per  $\mu$ l in vergelijking met individuen met het 419HH genotype ( $p = 0,019$ ; figuur 14A). De tijd tot het moment dat de CD4 aantallen beneden de 200 cellen per  $\mu$ l zijn gedaald is niet verschillend tussen de verschillende genotypen en dit komt waarschijnlijk doordat individuen met het 419HY/419YY genotype een langzamere CD4 daling laten zien nadat CD4 aantallen beneden de 400 cellen per  $\mu$ l zijn bereikt ( $p = 0,080$ ; figuur 14A). Er werden geen verschillen gevonden tussen het aantal CD4 cellen en de virale load op 1,5 en 5 jaar na seroconversie tussen de verschillende genotypen. In de R5 progressors werd geen verschil gevonden in het verloop van de infectie, CD4 aantal en de virale RNA load op 1,5 en 5 jaar na seroconversie tussen de individuen met of zonder SNP (figuur 14B). In de X4 progressors werd gevonden dat individuen met het 419HY/419YY genotype eerder CD4 aantallen beneden de 400 cellen per  $\mu$ l bereiken dan individuen met het 419HH genotype ( $p = 0,032$ ; figuur 14C). Ook werden er in deze groep geen verschillen gevonden in de tijd van seroconversie tot het moment dat de CD4 cellen onder de 200 cellen per  $\mu$ l zijn gedaald, en dit komt doordat er een langzamere CD4 daling is in individuen met het 419HY/419YY genotype ten opzichte van individuen met het 419HH genotype ( $p = 0,024$ ; figuur 14C). Ook hier werden geen verschillen gevonden in de CD4 aantallen en de virale RNA load op 1,5 en 5 jaar na seroconversie.

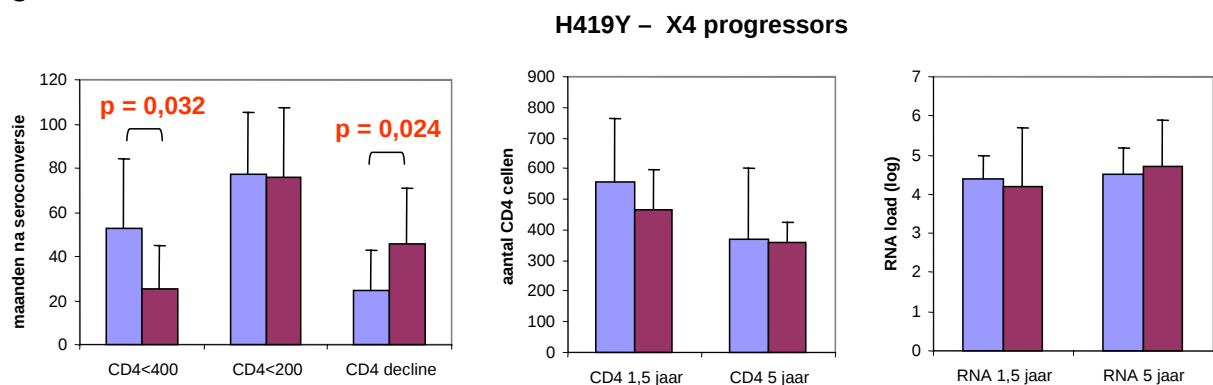
A



B



C



**Figuur 14** Grafieken van de H419Y SNP in de HIV-1 geïnfecteerde groep voor de individuen met het 419HH en 419HY/419YY genotype. Hier is het aantal maanden na seroconversie tot het moment dat het aantal CD4 cellen beneden de 400 per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4<400), de tijd van seroconversie tot het moment dat het aantal CD4 cellen beneden de 200 per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4<200) en de tijd tussen het moment dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 400 per  $\mu$ l zijn gedaald tot aan het moment dat de CD4 cellen voor het eerst onder de 200 cellen per  $\mu$ l zijn gedaald (CD4 daling) weergegeven. Ook is het aantal CD4 cellen en RNA load (log) op setpoint (1,5 jaar na seroconversie) en 5 jaar na seroconversie weergegeven. (A) H419Y SNP in de totale HIV-1 geïnfecteerde groep. (B) H419Y SNP in de R5 progressors. (C) H419Y SNP in de X4 progressors.

Blauw zijn de individuen met het 419HH genotype, paars zijn de individuen met het 419HY of 419YY genotype. p is de significante waarde.

## 4. Discussie en conclusie

In deze studie werd er gekeken naar het effect van single nucleotide polymorfismes in het Trim5α gen. Trim5α is een cellulaire factor die HIV-1 replicatie kan blokkeren in een vroege stap na entry in infectie. In het Trim5α gen komen 5 coding SNPs voor: H43Y, V112F, R136Q, G249D en H419Y. Voor 4 van deze SNPs (H43Y, V112F, R136Q en H419Y) werd een analyse gedaan in 104 HIV-1 negatieve individuen, 170 HIV-1 geïnfecteerde individuen en 46 HRSN individuen.

In de literatuur is beschreven dat de H43Y SNP *in vitro* een verlaagde antivirale activiteit van het Trim5α eiwit veroorzaakt [17,18], maar dit wordt niet bevestigd door een andere studie waar geen verlaging van de antivirale activiteit van Trim5α wordt gevonden [15]. Als de H43Y SNP een verlaging van de antivirale activiteit van het Trim5α eiwit geeft kan dit twee dingen betekenen. Ten eerste dat mensen die een Y op positie 43 in het Trim5α gen hebben gevoeliger zijn voor HIV-1 infectie. Ten tweede kan het zijn dat HIV-1 geïnfecteerde mensen die een Y op positie 43 van het Trim5α gen hebben een versnelde progressie naar AIDS doormaken omdat Trim5α minder goed in staat is om virus replicatie onder controle te houden.

Als een Y op positie 43 mensen gevoeliger maakt voor een HIV-1 infectie zou dit kunnen betekenen dat de frequentie van deze SNP verhoogd is in de HIV-1 geïnfecteerde groep ten opzichte van de HIV-1 negatieve controle groep en de HRSN groep en/of dat de frequentie verlaagd is in de HRSN groep ten opzichte van de HIV-1 negatieve controle groep en de HIV-1 positieve groep. In deze studie werd in de HIV-1 negatieve controles een allel frequentie van 0.106 gevonden, dit is vergelijkbaar met andere studies waar 0.114 [17] en 0.11 [15] werd gevonden. In de HIV-1 geïnfecteerde groep werd een allel frequentie van 0.099 gevonden, dit is niet significant verschillend van de groep HIV-1 negatieve controles. In de HRSN groep werd een allel frequentie van 0.167 gevonden. In tegenstelling tot de verwachting is de frequentie in de HRSN groep verhoogd ten opzichte van de HIV-1 geïnfecteerde groep en de HIV-1 negatieve controles, maar dit verschil is net niet significant. Om er zeker van te zijn dat de allel frequentie van de H43Y SNP verhoogd is in de HRSN groep ten opzichte van de HIV-1 geïnfecteerde groep zal de HRSN groep moeten worden uitgebreid. In vergelijkbare studies zijn geen verschillen in de allel frequentie van de H43Y SNP in de HRSN en de HIV-1 geïnfecteerde groep gevonden [16,17]. Er kan geconcludeerd worden dat de Y op positie 43 *in vivo* niet zorgt voor een verhoogde gevoeligheid voor HIV- infectie.

In de HIV-1 geïnfecteerde groep is er gekeken of de H43Y SNP in het Trim5α gen invloed heeft op het verloop van infectie. In de totale groep zijn geen verschillen gevonden in het aantal CD4 cellen en de virale RNA load op 1,5 en 5 jaar na infectie tussen de groep met of zonder SNP. Ook zijn er geen verschillen gevonden in tijd van infectie tot het moment dat het CD4 aantal onder de 400 cellen per µl en 200 cellen per µl zaten. In de totale groep is er geen effect van de H43Y SNP in Trim5α op ziekte progressie gevonden.

In een eerdere studie is gevonden dat in 50% van de HIV-1 geïnfecteerde mensen het virus verandert van co-receptor gebruik [19]. Een persoon raakt geïnfecteerd met virussen die CCR5 als co-receptor gebruiken en tijdens het verloop van de infectie kan het virus overgaan op het gebruik van CXCR4 als co-receptor. Wat bepaald of deze switch plaats vindt is niet bekend. Om te analyseren of het effect van SNPs in het Trim5α gen verschilt tussen mensen die geïnfecteerd zijn met alleen CCR5 gebruikende virussen en mensen die tijdens het verloop van de infectie CXCR4 gebruikende virussen ontwikkelen, is het effect van de SNPs in deze 2 groepen apart geanalyseerd. In mensen met alleen CCR5 gebruikende virussen (R5 progressors) zijn net als in de totale groep ook geen verschillen in ziekte progressie gevonden.

tussen de mensen met of zonder de H43Y SNP. In mensen die tijdens de infectie CXCR4 virussen ontwikkelen (X4 progressors) is een significant verschil gevonden tussen mensen met en zonder de SNP wanneer de tijd na infectie tot het moment dat de CD4 cellen onder de 400 cellen per  $\mu\text{l}$  komen is vergeleken. Mensen met het 43HY of 43YY genotype bereiken veel eerder een CD4 aantal beneden de 400 cellen per  $\mu\text{l}$  en ook het aantal CD4 cellen op 5 jaar na infectie is hier lager (dit laatste is net niet significant). De tijd tot dat het aantal CD4 cellen beneden de 200 cellen per  $\mu\text{l}$  is gedaald is echter niet verschillend. Deze data suggereren dat ziekte progressie in de X4 progressors in de eerste fase van de ziekte sneller verloopt, maar er worden geen verschillen op het totale verloop van de ziekte gevonden.

In deze studie werd het ziekte verloop vergeleken tussen het 43HH en het 43HY of 43YY genotype en werd er geen effect van deze SNP op ziekte progressie gevonden. In de HIV-1 geïnfecteerde mensen was het aantal mensen met een homozygoot 43YY genotype te laag om deze groep apart te analyseren. Hier kan echter niet uitgesloten worden dat er een effect van het 43YY genotype op het verloop van HIV-1 infectie is. Om dit te bestuderen zal de groep HIV-1 geïnfecteerde mensen moeten worden uitgebreid.

Ook voor de V112F SNP in het Trim5α gen werd beschreven dat het hebben van een F op positie 112 *in vitro* leidt tot een verminderde antivirale activiteit van het Trim5α eiwit ten opzichte van de variant met een V op positie 112 [17]. Net zoals bij de H43Y SNP kan deze verminderde antivirale activiteit een effect hebben op de gevoeligheid voor HIV-1 infectie en/of een effect hebben op het ziekte verloop.

Als de SNP invloed heeft op de gevoeligheid voor een HIV-1 infectie zou de F op positie 112 verhoogd in de HIV-1 geïnfecteerde groep ten opzichte van de HIV-1 negatieve controle groep en de HRSN groep en/of verlaagd in de HRSN groep ten opzichte van de HIV-1 negatieve controle groep en de HIV-1 geïnfecteerde groep kunnen voorkomen. In de HIV-1 negatieve controle groep werd een allel frequentie van 0.067 gevonden, dit is vergelijkbaar met andere studies waar 0.063 [17] en 0.08 [15] werd gevonden. In de HIV-1 geïnfecteerde groep werd een vergelijkbare allel frequentie van 0.079 gevonden. In de HRSN groep werd een frequentie van 0.098 gevonden. De relatief hoge allel frequentie in de HRSN groep kan veroorzaakt worden doordat er een relatief kleine groep van 46 individuen werd getest, maar de verschillen tussen de allel frequentie in de HRSN groep en de HIV-1 positieve groep of de HIV-1 negatieve controle groep zijn niet significant. In deze studie heeft de F op positie 112 geen invloed op de gevoeligheid voor HIV-1 infectie en dit komt overeen met eerdere studies [15,17].

Vervolgens werd er gekeken naar de invloed van de V112F SNP in Trim5α op de ziekte progressie in de HIV-1 positieve groep. Hier werden geen verschillen gevonden in de tijd van seroconversie tot het moment dat de CD4 cellen onder de 400 of 200 cellen per  $\mu\text{l}$  waren gedaald in de totale groep tussen individuen met een V of een F op positie 112. Ook wanneer de groep werd opgesplitst in R5- en X4-progressors werd er geen verschil in het verloop van de ziekte tussen mensen met of zonder de V112F SNP gevonden. Ook zijn er geen verschillen gevonden in de CD4 aantallen tussen individuen met een V of een F op positie 112. In de virale RNA load op 5 jaar na seroconversie werd een significant lagere load in individuen met een F op positie 112 gevonden. De verlaagde virale load zou kunnen betekenen dat een F op positie 112 geassocieerd is met een gunstiger verloop van de infectie, maar dit is alleen gevonden in de totale groep en niet wanneer de R5- en X4-progressors apart worden geanalyseerd. Ook wordt het gunstiger verloop van de infectie niet bevestigd door verschillen in het aantal CD4 cellen per  $\mu\text{l}$  op 5 jaar na seroconversie en de tijd tussen seroconversie en het moment wanneer de CD4 cellen zijn gedaald tot onder 400 en 200 cellen per  $\mu\text{l}$ . Hieruit is geconcludeerd dat de V112F SNP geen invloed heeft op ziekte progressie.

De groep met de V112F SNP bestaat uit individuen die heterozygoot zijn voor het genotype en die zowel een Trim5α gen hebben met een V en een F op positie 112. Er werden geen

individueen met alleen een F op positie 112 gevonden. In deze studie kan echter niet uitgesloten worden dat het 112FF genotype invloed heeft op de gevoeligheid voor HIV-1 infectie en het verloop van de ziekte. Om dit te testen zou er in een grotere groep moeten worden getest zodat het 112FF genotype apart kan worden geanalyseerd.

De R136Q SNP is *in vitro* geassocieerd met een verhoogde antivirale activiteit van het Trim5α eiwit [17], maar dit wordt niet bevestigd door andere studies [15,16,20]. Als de R136Q SNP inderdaad geassocieerd is met verhoogde Trim5α activiteit, kan dit betekenen dat mensen met een Q op positie 136 in het Trim5α gen minder gevoelig zijn voor HIV-1 infectie of dat de Q een vertraagde progressie tot gevolg heeft doordat het de virus replicatie *in vivo* beter onder controle kan houden.

Als de R136Q invloed heeft op de gevoeligheid voor HIV-1 infectie zou er een verlaging in de frequentie van deze SNP worden verwacht in de HIV-1 geïnfecteerde groep ten opzichte van de HIV-1 negatieve controle groep en de HRSN groep. Ook zou er een verhoogde frequentie van de R136Q SNP in de HRSN groep ten opzichte van de controle groep en de HIV-1 geïnfecteerde groep gevonden kunnen worden. In de HIV-1 negatieve controle groep werd een allel frequentie van 0.389 gevonden, dit is vergelijkbaar met een frequentie van 0.372 [17] en 0.35 [15] gevonden in andere studies. In de HIV-1 geïnfecteerde groep werd een allel frequentie van 0.391 gevonden en dit komt overeen met de frequentie van de controle groep. In de HRSN groep werd een allel frequentie van 0.291 gevonden. De allel frequentie in de HRSN groep is verlaagd ten opzichte van de controle groep en de HIV-1 geïnfecteerde groep, maar deze verschillen zijn niet significant. In de studie van Spielmon et.al heeft men ook een verlaagde frequentie van de R136Q SNP gevonden in de HRSN groep ten opzichte van de HIV-1 geïnfecteerde groep [16]. De resultaten uit deze studie en de resultaten van Spielmon et.al. komen niet overeen met de observatie van Javanbakht et.al, die een verhoogde antivirale activiteit van de R136Q SNP in Trim5α en een verlaagde frequentie van de R136Q SNP in de HIV-1 geïnfecteerde groep ten opzichte van de HIV-1 negatieve groep aantonen [17]. Uit deze studie is te concluderen dat de Q op positie 136 in Trim5α niet een verminderde gevoeligheid voor HIV-1 infectie tot gevolg heeft.

Ook werd er gekeken naar de invloed van de R136Q SNP in Trim5α op het verloop van HIV-1 infectie. Als de R136Q SNP de antivirale activiteit van Trim5α verhoogt, is te verwachten dat Trim5α de virusrepliatie beter kan controleren waardoor de ziekte progressie vertraagt. In de totale groep werden geen significante verschillen gevonden in de tijd tussen seroconversie en het moment dat de CD4 cellen beneden de 400 en 200 cellen per  $\mu$ l zijn gedaald in mensen die heterozygoot of homozygoot zijn voor de R136Q SNP ten opzichte van de mensen die alleen een R op positie 136 hebben. Ook werden er geen verschillen in het aantal CD4 cellen en de virale RNA load gevonden op 1,5 en 5 jaar na seroconversie tussen de individuen met of zonder deze SNP. Vergelijkbaar met de studie van Spielmon et al. werd er geen effect van de R136Q SNP op het verloop van de ziekte gevonden. In de R5 progressors werd een versnelde progressie gevonden naar het moment dat de CD4 cellen onder de 400 cellen per  $\mu$ l waren gedaald in zowel de mensen die heterozygoot als homozygoot zijn voor de R136Q SNP, maar deze verschillen zijn niet significant. In de R5-progressors werden geen verschillen in de tijd totdat de CD4 cellen beneden de 200 cellen per  $\mu$ l waren gedaald, het aantal CD4 cellen en de virale RNA load op 1,5 en 5 jaar gevonden. Hieruit is te concluderen dat de R136Q SNP in deze groep geen effect heeft op het ziekte verloop. In de X4 progressors is te zien dat mensen die hetero- of homozygoot zijn voor de R136Q SNP een trager ziekte verloop hebben. Er is een significant langere tijd te zien tot het moment dat de CD4 cellen beneden de 200 cellen per  $\mu$ l zijn gedaald in mensen met het 136RQ genotype ten opzichte van mensen met het 136RR genotype. Ook werd er gevonden dat mensen die een R op positie 136 hebben een significant hoger CD4 aantal en een significant lagere virale RNA load hebben 5 jaar na infectie. In de X4-progressors is te zien dat de R136Q SNP geassocieerd is

met een vertraagde ziekte progressie en dit komt overeen met de beschreven verhoogde antivirale activiteit van Trim5α met de R136Q SNP [17]. Opmerkelijk is dat er alleen een effect van de R136Q SNP gevonden wordt in de X4-progressors en niet in de R5-progressors. In X4-progressors ontstaan tijdens het verloop van de infectie virus varianten die in plaats van CCR5 CXCR4 als co-receptor kunnen gebruiken. Een mogelijke verklaring van het effect van de R136Q SNP op het verloop van ziekte progressie in de X4-progressors zou kunnen zijn dat virus varianten die CXCR4 als co-receptor kunnen gebruiken gevoeliger zijn voor Trim5α doordat ze bijvoorbeeld een cel type kunnen infecteren die meer Trim5α tot expressie brengen waardoor het effect van een hogere antivirale activiteit door de aanwezigheid van de R136Q SNP een groter effect op virus replicatie heeft.

De H419Y SNP in het Trim5α eiwit is niet geassocieerd met een verschil in de antivirale activiteit van het eiwit *in vitro* [15,17,20]. Op grond hiervan wordt verwacht dat deze SNP geen effect zal hebben op de gevoeligheid voor HIV-1 infectie en dat er geen verschillen worden gevonden in de allel frequenties tussen de verschillende groepen. Ook wordt er op grond van de literatuur gegevens geen effect van de H419Y SNP op het verloop van ziekte in HIV-1 geïnfecteerde mensen verwacht.

In de HIV-1 negatieve controle groep werd een allel frequentie van 0.058 gevonden, dit is vergelijkbaar met resultaten van twee andere studies waar een allel frequentie van 0.055 [17] en 0.05 [15] werd gevonden. In de HIV-1 geïnfecteerde individuen in deze studie werd een allel frequentie van 0.066 gevonden, ook dit is niet significant verschillend van de frequentie gevonden in de HIV-1 negatieve controle groep. In de HRSN groep in deze studie werd een frequentie van 0.087 gevonden, en ook deze frequentie verschilt niet significant van de controle groep en HIV-1 geïnfecteerde groep in deze studie. In overeenstemming met eerdere studies [16,17] werden er vergelijkbare allel frequenties in de verschillende groepen gevonden en is te concluderen dat de H419Y SNP in het Trim5α gen geen invloed heeft op de gevoeligheid voor HIV-1 infectie.

Vervolgens werd er gekeken naar het effect van de H419Y SNP op het verloop van een HIV-1 infectie. Hier werd in de totale groep, en in de R5- en X4-progressors apart gevonden dat mensen met een Y op positie 419 een versnelde progressie van seroconversie tot het moment dat de CD4 cellen beneden de 400 cellen per  $\mu$ l zijn gedaald doormaken. Er is echter geen verschil tussen mensen met en zonder de H419Y SNP in de tijd tot CD4 cellen beneden de 200 per  $\mu$ l gevonden. Ook werden er geen verschillen gevonden tussen het aantal CD4 cellen en de virale RNA load op 1,5 en 5 jaar na infectie. Ook al lijkt er een verschil te zijn in het verloop van de eerste fase van infectie totdat het aantal CD4 cellen gedaald is tot beneden de 400 cellen per  $\mu$ l, zijn er geen verschillen gevonden in het verloop van infectie tussen mensen die wel of geen H419Y SNP bezitten als de late fase van infectie wordt bestudeerd. Hieruit is te concluderen dat de H419Y geen invloed heeft op het totale verloop van de infectie.

In deze studie kan echter niet uitgesloten worden dat het 419YY geen genotype invloed heeft op de gevoeligheid voor HIV-1 infectie en het verloop van de ziekte. Om dit te testen zou er in een grotere groep moeten worden getest zodat het 419YY genotype apart kan worden geanalyseerd.

De G249D SNP in het Trim5α eiwit is niet geassocieerd met een verschil in de antivirale activiteit van het eiwit *in vitro* [15,17,20]. Wel zijn de allel frequenties van deze SNP bekend. In de HIV-1 negatieve controle groep werden allel frequenties van 0.060 [17] en 0.08 [15] gevonden, in de HIV-1 geïnfecteerde groep werd een frequentie van 0.063 [17] gevonden en in de HRSN groep werd een allel frequentie van 0.074 [17] gevonden. Op grond van deze gegevens zou je niet verwachten dat de SNP invloed heeft op de gevoeligheid voor een HIV-1 infectie. De detectie methode voor de G249D SNP is nu opgezet zodat de invloed van deze SNP op ziekte progressie kan worden bestudeerd.

In de literatuur is het 136QQ genotype nooit gevonden in combinatie met een Y op positie 43, D op positie 249 en een Y op positie 419 [15]. Dit betekent dat 136Q niet op hetzelfde gen voorkomt als de 43Y, 249D en de 419Y. Ook in deze studie is het 136QQ genotype nooit samen gevonden met een 43Y en een 249D genotype. Echter in de HIV-1 negatieve controle groep werd een individu gevonden met het 136QQ genotype in combinatie met een 419HY genotype. Waarschijnlijk komt dit gecombineerde genotype in zulke lage frequenties voor dat het in een eerdere studie niet werd gevonden [15]. Ook werd in de HIV-1 geïnfecteerde individuen een individu met het 136QQ genotype in combinatie met een 112VF genotype gevonden. Deze laatste combinatie is echter niet in de literatuur beschreven en komt waarschijnlijk ook maar in zeer lage frequenties voor.

In deze studie werd niet gekeken naar het effect van gecombineerde genotypen in het Trim5 $\alpha$  gen op de gevoeligheid voor HIV-1 infectie omdat het aantal individuen met gecombineerde genotypen te laag is om een betrouwbare analyse uit te voeren.

## 5. Literatuurlijst

- 1 Kootstra, N.A., Verma, I.M., *Gene therapy with viral vectors*, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2003 Apr, Vol. 43, p. 413-439
- 2 Simon, V., Ho, D.D., Abdool Karim, Q., *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment*, Lancet, 2006 Aug, Vol. 368, p. 489-504
- 3 Sierra, S., Kupfer, B., Kaiser, R., *Basics of the virology of HIV-1 and its replication*, Journal of Clinical Virology, 2005 Dec, Vol. 34, p. 233-244
- 4 Zheng, Y.H., Lovsin, N., Peterlin, B.M., *Newly identified host factors modulate HIV replication*, Immunology Letters, 2005 Mar, Vol. 97, p. 225-234
- 5 Kootstra, N., *HIV-1 replication in macrophages*, 1999 Sep
- 6 Meiering, C.D., Linial M.L., *Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection*, Clinical Microbiology Reviews, 2001 Jan, Vol. 14, p. 165-176
- 7 Overbaugh, J., Miller, A.D., Eiden, M.V., *Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins*, 2001 Sep, Vol. 65, p. 371-389
- 8 Op de Coul, E.L.M., van de Laar, M.J.W., *Wat zijn aids en hiv-infectie en wat is het beloop?*, Nationaal Kompas Volksgezondheid, versie 3.9, 1 maart 2007, © RIVM, Bilthoven
- 9 Roit, I., Brostoff, J., Male, D., *Immunology*, Sixth edition, 2001, ISBN: 0-7234-3189-2
- 10 *HIV-infectie, Acquired Immunodeficiency Syndrome (Aids)*, RIVM report, 2005 Nov
- 11 van Rij, R.P., Schuitemaker, H., *Host genetic factors in the clinical course of HIV-1 infection: chemokines and chemokine receptors*, Community Genetics, 2002, Vol. 2, p. 88-101
- 12 Lederman, M.M., Penn-Nicholson, A., Cho, M., Mosier, D., *Biology of CCR5 and Its Role in HIV Infection and Treatment*, JAMA, 2006 Aug, Vol. 296, p. 815-826
- 13 Sokolskaja E., Luban, J., *Cyclophilin, TRIM5, and innate immunity to HIV-1*, Current Opinion in Microbiology, 2006 Aug, Vol. 9, p. 404-408
- 14 Nisole, S., Stoye, J.P., Saïb, A., *Trim family proteins: retroviral restriction and antiviral defence*, Nature Reviews Microbiology, 2005 Oct, Vol. 3, p. 799-808
- 15 Goldschmidt, V., Bleiber, G., May, M., Martinez, R., Ortiz, M., Telenti, A., *Role of common human Trim5α variants in HIV-1 disease progression*, Retrovirology, 2006 Aug, Vol. 3
- 16 Speelman, E.C., Livingston-Rosanoff, D., Li S.S., Vu, Q., Bui, J., Geraghty, D.E., Zhao, L.P., McElrath, M.J., *Genetic Association of the Antiviral Restriction Factor Trim5α with Human Immunodeficiency virus Type 1 Infection*, Journal of Virology, 2006 Mar, Vol. 80, p. 2463-2471
- 17 Javanbakht, H., An, P., Gold, B., Petersen, D.C., O'Huigen, C., Nelson, G.W., O'Brien, S.J., Kirk, G.D., Detels, R., Buchbinder, S., Donfield, S., Shulenin, S., Song, B., Perron, M.J., Stremlau, M., Sodroski, J., Dean, M., Winkler, C., *Effects of human Trim5α polymorphisms on antiretroviral function and susceptibility to human immunodeficiency virus infection*, Virology, 2006 Oct, Vol. 354, p. 15-27
- 18 Nakayama, E.E., Carpentier, W., Costagliola, D., Shioda, T., Iwamoto, A., Debre, P., Yoshimura, K., Autran, B., Matsushita, S., Theodorou, I., *Wild type and H43Y variant of human TRIM5α show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro*, Immunogenetics, 2007 Jun, Vol. 59, p. 511-515
- 19 Koot, M., van Leeuwen, R., de Goede, R.E.Y., Keet, I.P., Danner, S., Eeftinck Schattenkerk, J.K.M., Reiss, P., Tersmette, M., Lange, J.M.A., Schuitemaker, H.,

- Conversion Rate towards a Syncytium-Inducing (SI) Phenotype during Different Stages of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Prognostic Value of SI Phenotype for Survival after AIDS Diagnosis*, The Journal of Infectious Diseases, 1999 Jan, Vol. 179, p. 254-258
- 20 Sawyer, S.L., Wu, L.I., Akey, J.M., Emerman, M., Malik, H.S., *High-Frequency Persistence of an Impaired Allele of the Retroviral Defense Gene Trim5α in Humans*, Current Biology, 2006 Jan, Vol. 16, p. 95-100

## Bijlage I: Lijst met alle significante waarde van de verschillende SNPs

In deze bijlage zijn de exacte waarde van de significantie (T-test), gemiddelde (Average) en standaarddeviatie (STD) weergegeven. Dit is voor elke SNP en voor elke parameter in de totale, CCR5 progressors en CXCR4 progressors gedaan. Een 0 is hier het wildtype en een 1 een SNP met mutatie. Voor de R136Q SNP zijn er twee kolommen. In de eerste wordt het 136RQ genotype vergeleken met het 136RR genotype en in de tweede kolom wordt het 136QQ genotype vergeleken met het 136RR genotype. De significanties zijn dikgedrukt, de rode getallen zijn de echte significanties, de blauwe getallen zijn de waardes tussen 0,05 en 0,10 en de groene getallen zijn de waardes tussen 0,10 en 0,20.

### Totale groep

|              |         |   | H43Y          | V112F         | R136Q         | R136Q         | H419Y         |
|--------------|---------|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|              |         |   |               |               | 136RQ         | 136QQ         |               |
| CD4<400      | T-test  |   | <b>0,8950</b> | <b>0,7777</b> | <b>0,7288</b> | <b>0,5849</b> | <b>0,0188</b> |
|              | Average | 0 | 54,4          | 54,7          | 56,1          | 56,1          | 56,6          |
|              |         | 1 | 53,5          | 52,6          | 54,1          | 51,1          | 37,8          |
|              | STD     | 0 | 32,9          | 33,9          | 37,6          | 37,6          | 33,9          |
|              |         | 1 | 36,6          | 33,6          | 30,6          | 32,0          | 26,4          |
|              |         |   |               |               |               |               |               |
|              |         |   |               |               |               |               |               |
| CD4<200      | T-test  |   | <b>0,3055</b> | <b>0,6379</b> | <b>0,1122</b> | <b>0,9054</b> | <b>0,8120</b> |
|              | Average | 0 | 81,6          | 81,0          | 76,7          | 76,7          | 80,5          |
|              |         | 1 | 75,5          | 78,1          | 84,5          | 77,7          | 78,9          |
|              | STD     | 0 | 28,6          | 28,3          | 32,2          | 32,2          | 29,0          |
|              |         | 1 | 29,4          | 31,0          | 25,3          | 29,9          | 27,7          |
|              |         |   |               |               |               |               |               |
|              |         |   |               |               |               |               |               |
| CD4 decline  | T-test  |   | <b>0,9303</b> | <b>0,8343</b> | <b>0,0832</b> | <b>0,2992</b> | <b>0,0804</b> |
|              | Average | 0 | 25,0          | 24,7          | 20,9          | 20,9          | 23,7          |
|              |         | 1 | 24,6          | 25,7          | 27,3          | 26,9          | 33,0          |
|              | STD     | 0 | 18,0          | 16,4          | 16,2          | 16,2          | 15,7          |
|              |         | 1 | 12,0          | 18,9          | 16,5          | 18,8          | 22,2          |
|              |         |   |               |               |               |               |               |
|              |         |   |               |               |               |               |               |
| CD4 setpoint | T-test  |   | <b>0,3383</b> | <b>0,8258</b> | <b>0,6683</b> | <b>0,5672</b> | <b>0,2272</b> |
|              | Average | 0 | 580           | 570           | 574           | 574           | 581           |
|              |         | 1 | 521           | 584           | 554           | 620           | 500           |
|              | STD     | 0 | 247           | 224           | 252           | 252           | 245           |
|              |         | 1 | 208           | 334           | 224           | 285           | 217           |

|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|--------------|--|---------|---|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4 5 yr     |  | T-test  |   | <b>0,7354</b> |  | <b>0,2432</b> |  | <b>0,8938</b> |  | <b>0,4844</b> |  | <b>0,3419</b> |
|              |  | Average | 0 | 397           |  | 406           |  | 388           |  | 388           |  | 401           |
|              |  |         | 1 | 381           |  | 350           |  | 393           |  | 434           |  | 347           |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  | STD     | 0 | 215           |  | 225           |  | 245           |  | 245           |  | 232           |
|              |  |         | 1 | 269           |  | 217           |  | 196           |  | 267           |  | 158           |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| RNA setpoint |  | T-test  |   | <b>0,9521</b> |  | <b>0,8975</b> |  | <b>0,7543</b> |  | <b>0,2183</b> |  | <b>0,5848</b> |
|              |  | Average | 0 | 4,3           |  | 4,3           |  | 4,2           |  | 4,2           |  | 4,3           |
|              |  |         | 1 | 4,3           |  | 4,3           |  | 4,3           |  | 4,5           |  | 4,4           |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  | STD     | 0 | 0,8           |  | 0,7           |  | 0,8           |  | 0,8           |  | 0,7           |
|              |  |         | 1 | 0,6           |  | 0,8           |  | 0,7           |  | 0,5           |  | 0,9           |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| RNA 5 yr     |  | T-test  |   | <b>0,6688</b> |  | <b>0,0446</b> |  | <b>0,5821</b> |  | <b>0,7487</b> |  | <b>0,5357</b> |
|              |  | Average | 0 | 4,4           |  | 4,5           |  | 4,4           |  | 4,4           |  | 4,4           |
|              |  |         | 1 | 4,5           |  | 4,0           |  | 4,5           |  | 4,3           |  | 4,6           |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  | STD     | 0 | 0,8           |  | 0,8           |  | 0,8           |  | 0,8           |  | 0,8           |
|              |  |         | 1 | 0,5           |  | 0,7           |  | 0,8           |  | 0,8           |  | 0,9           |

**CCR5 progressors**

|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|--------------|--|---------|---|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|
|              |  |         |   | H43Y          |  | V112F         |  | R136Q         |  | R136Q         |  | H419Y         |
|              |  |         |   |               |  |               |  | 136RQ         |  | 136QQ         |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4<400      |  | T-test  |   | <b>0,1398</b> |  | <b>0,9830</b> |  | <b>0,0771</b> |  | <b>0,0729</b> |  | <b>0,1342</b> |
|              |  | Average | 0 | 55,3          |  | 57,7          |  | 68,0          |  | 68,0          |  | 60,1          |
|              |  |         | 1 | 69,2          |  | 58,0          |  | 54,2          |  | 45,4          |  | 44,4          |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  | STD     | 0 | 34,1          |  | 35,9          |  | 36,5          |  | 36,5          |  | 35,6          |
|              |  |         | 1 | 37,2          |  | 30,8          |  | 32,5          |  | 32,3          |  | 27,9          |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4<200      |  | T-test  |   | <b>0,8074</b> |  | <b>0,8775</b> |  | <b>0,8927</b> |  | <b>0,2984</b> |  | <b>0,7679</b> |
|              |  | Average | 0 | 83,3          |  | 82,9          |  | 84,3          |  | 84,3          |  | 83,2          |
|              |  |         | 1 | 81,4          |  | 81,5          |  | 85,2          |  | 72,8          |  | 80,6          |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  | STD     | 0 | 29,3          |  | 29,0          |  | 31,1          |  | 31,1          |  | 29,7          |
|              |  |         | 1 | 29,4          |  | 32,2          |  | 26,4          |  | 33,1          |  | 26,4          |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4 decline  |  | T-test  |   | <b>0,6069</b> |  | <b>0,3584</b> |  | <b>0,0133</b> |  | <b>0,0296</b> |  | <b>0,9663</b> |
|              |  | Average | 0 | 22,6          |  | 22,8          |  | 15,3          |  | 15,3          |  | 22,3          |
|              |  |         | 1 | 20,3          |  | 17,8          |  | 25,0          |  | 27,3          |  | 22,5          |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  | STD     | 0 | 12,3          |  | 12,4          |  | 8,9           |  | 8,9           |  | 12,2          |
|              |  |         | 1 | 12,8          |  | 11,2          |  | 12,3          |  | 13,4          |  | 13,4          |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4 setpoint |  | T-test  |   | <b>0,4458</b> |  | <b>0,1189</b> |  | <b>0,1614</b> |  | <b>0,7342</b> |  | <b>0,4869</b> |
|              |  | Average | 0 | 602           |  | 575           |  | 640           |  | 640           |  | 599           |
|              |  |         | 1 | 528           |  | 734           |  | 545           |  | 603           |  | 528           |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  | STD     | 0 | 271           |  | 242           |  | 257           |  | 257           |  | 269           |
|              |  |         | 1 | 245           |  | 416           |  | 256           |  | 339           |  | 279           |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4 5 yr     |  | T-test  |   | <b>0,3460</b> |  | <b>0,3971</b> |  | <b>0,3281</b> |  | <b>0,2964</b> |  | <b>0,1853</b> |
|              |  | Average | 0 | 406           |  | 425           |  | 458           |  | 458           |  | 431           |
|              |  |         | 1 | 464           |  | 366           |  | 405           |  | 367           |  | 342           |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  | STD     | 0 | 198           |  | 222           |  | 251           |  | 251           |  | 227           |
|              |  |         | 1 | 305           |  | 234           |  | 205           |  | 180           |  | 183           |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |  |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |

|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|--------------|---------|---|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|
| RNA setpoint | T-test  |   | <b>0,9152</b> |  | <b>0,9888</b> |  | <b>0,6598</b> |  | <b>0,1229</b> |  | <b>0,1712</b> |
|              | Average | 0 | 4,2           |  | 4,2           |  | 4,1           |  | 4,1           |  | 4,2           |
|              |         | 1 | 4,2           |  | 4,2           |  | 4,2           |  | 4,6           |  | 4,6           |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              | STD     | 0 | 0,8           |  | 0,7           |  | 0,7           |  | 0,7           |  | 0,8           |
|              |         | 1 | 0,6           |  | 0,8           |  | 0,8           |  | 0,4           |  | 0,2           |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| RNA 5 yr     | T-test  |   | <b>0,4959</b> |  | <b>0,1723</b> |  | <b>0,1839</b> |  | <b>0,1419</b> |  | <b>0,7285</b> |
|              | Average | 0 | 4,3           |  | 4,4           |  | 4,0           |  | 4,0           |  | 4,3           |
|              |         | 1 | 4,1           |  | 3,9           |  | 4,4           |  | 4,6           |  | 4,5           |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              | STD     | 0 | 0,8           |  | 0,8           |  | 0,8           |  | 0,8           |  | 0,8           |
|              |         | 1 | 0,6           |  | 0,8           |  | 0,9           |  | 0,4           |  | 0,4           |

**CXCR4 progressors**

|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|--------------|---------|---|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|
|              |         |   | H43Y          |  | V112F         |  | R136Q         |  | R136Q         |  | H419Y         |
|              |         |   |               |  |               |  | 136RQ         |  | 136QQ         |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4<400      | T-test  |   | <b>0,0245</b> |  | <b>0,8018</b> |  | <b>0,0941</b> |  | <b>0,2025</b> |  | <b>0,0316</b> |
|              | Average | 0 | 53,3          |  | 50,4          |  | 40,5          |  | 40,5          |  | 52,4          |
|              |         | 1 | 31,2          |  | 48,0          |  | 54,1          |  | 56,8          |  | 25,6          |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              | STD     | 0 | 31,7          |  | 30,7          |  | 33,6          |  | 33,6          |  | 31,5          |
|              |         | 1 | 21,8          |  | 36,2          |  | 28,4          |  | 33,5          |  | 19,5          |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4<200      | T-test  |   | <b>0,1695</b> |  | <b>0,7039</b> |  | <b>0,0218</b> |  | <b>0,1566</b> |  | <b>0,8882</b> |
|              | Average | 0 | 79,4          |  | 78,4          |  | 66,8          |  | 66,8          |  | 77,3          |
|              |         | 1 | 67,2          |  | 75,2          |  | 83,5          |  | 83,1          |  | 75,7          |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              | STD     | 0 | 27,8          |  | 27,5          |  | 31,3          |  | 31,3          |  | 28,1          |
|              |         | 1 | 28,5          |  | 30,8          |  | 24,0          |  | 26,7          |  | 31,8          |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4 decline  | T-test  |   | <b>0,7812</b> |  | <b>0,6274</b> |  | <b>0,4245</b> |  | <b>0,7878</b> |  | <b>0,0241</b> |
|              | Average | 0 | 27,0          |  | 26,6          |  | 24,8          |  | 24,8          |  | 24,9          |
|              |         | 1 | 28,9          |  | 30,0          |  | 29,6          |  | 27,5          |  | 45,7          |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              | STD     | 0 | 21,6          |  | 19,5          |  | 19,0          |  | 19,0          |  | 18,2          |
|              |         | 1 | 10,0          |  | 21,2          |  | 19,8          |  | 26,8          |  | 25,4          |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4 setpoint | T-test  |   | <b>0,6211</b> |  | <b>0,2089</b> |  | <b>0,2212</b> |  | <b>0,1636</b> |  | <b>0,2829</b> |
|              | Average | 0 | 551           |  | 562           |  | 493           |  | 493           |  | 556           |
|              |         | 1 | 514           |  | 474           |  | 566           |  | 650           |  | 467           |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              | STD     | 0 | 208           |  | 198           |  | 226           |  | 226           |  | 210           |
|              |         | 1 | 178           |  | 221           |  | 180           |  | 181           |  | 129           |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| CD4 5 yr     | T-test  |   | <b>0,0681</b> |  | <b>0,5062</b> |  | <b>0,1302</b> |  | <b>0,0366</b> |  | <b>0,9447</b> |
|              | Average | 0 | 387           |  | 381           |  | 297           |  | 297           |  | 367           |
|              |         | 1 | 247           |  | 336           |  | 377           |  | 501           |  | 359           |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              | STD     | 0 | 234           |  | 229           |  | 208           |  | 208           |  | 235           |
|              |         | 1 | 114           |  | 209           |  | 185           |  | 329           |  | 65            |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |

|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|--------------|---------|---|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|--|---------------|
| RNA setpoint | T-test  |   | <b>0,8548</b> |  | <b>0,6914</b> |  | <b>0,9097</b> |  | <b>0,7773</b> |  | <b>0,5096</b> |
|              | Average | 0 | 4,4           |  | 4,4           |  | 4,4           |  | 4,4           |  | 4,4           |
|              |         | 1 | 4,4           |  | 4,3           |  | 4,4           |  | 4,5           |  | 4,2           |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              | STD     | 0 | 0,7           |  | 0,7           |  | 0,8           |  | 0,8           |  | 0,6           |
|              |         | 1 | 0,7           |  | 0,8           |  | 0,7           |  | 0,6           |  | 1,5           |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
| RNA 5 yr     | T-test  |   | <b>0,2415</b> |  | <b>0,1262</b> |  | <b>0,4009</b> |  | <b>0,0355</b> |  | <b>0,6591</b> |
|              | Average | 0 | 4,4           |  | 4,6           |  | 4,7           |  | 4,7           |  | 4,5           |
|              |         | 1 | 4,8           |  | 4,1           |  | 4,5           |  | 3,8           |  | 4,7           |
|              |         |   |               |  |               |  |               |  |               |  |               |
|              | STD     | 0 | 0,8           |  | 0,7           |  | 0,6           |  | 0,6           |  | 0,7           |
|              |         | 1 | 0,2           |  | 0,6           |  | 0,7           |  | 1,1           |  | 1,2           |

## Bijlage II: Nucleotide en aminozuursequentie van Trim5α voor de verschillende SNPs

### Trim5α Nucleotide sequentie

|              |                                                                                     |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|              | 10                                                                                  | 20    | 30    | 40    | 50    | 60    | 70    | 80    |
| Trim5α       | ATGGCTTCTGGAATCCTGGTTAATGTAAAGGAGGAGGTGACCTGCCCATCTGCCTGGAACCTCTGACACAACCCCTGAG     |       |       |       |       |       |       |       |
| Trim5α H43Y  | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α V112F | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α R136Q | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α G249D | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α H419Y | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
|              | 90                                                                                  | 100   | 110   | 120   | 130   | 140   | 150   | 160   |
| Trim5α       | CCTGGACTGCGGCCACAGCTTCTGCCAAGCATGCCCTCACTGCAAAACCCACAAGAAGTCCATGCTAGACAAAGGAGAGAGTA |       |       |       |       |       |       |       |
| Trim5α H43Y  | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α V112F | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α R136Q | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α G249D | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α H419Y | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
|              | 170                                                                                 | 180   | 190   | 200   | 210   | 220   | 230   | 240   |
| Trim5α       | GCTGCCCTGTGTGCGGGATCAGTTACCAGCCTGAGAACATACGGCCTAATCGGCATGTAGCCAACCTTAGTGGAGAAGCTC   |       |       |       |       |       |       |       |
| Trim5α H43Y  | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α V112F | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α R136Q | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α G249D | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α H419Y | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
|              | 250                                                                                 | 260   | 270   | 280   | 290   | 300   | 310   | 320   |
| Trim5α       | AGGGAGGTCAGTTGAGCCAGAGGGGCGAGAAAGTTGATCATTGTGCACGCCATGGAGAGAACTTCTACTCTTCTGTCA      |       |       |       |       |       |       |       |
| Trim5α H43Y  | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α V112F | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α R136Q | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α G249D | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α H419Y | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
|              | 330                                                                                 | 340   | 350   | 360   | 370   | 380   | 390   | 400   |
| Trim5α       | GGAGGACGGGAAGGTCAATTTGCTGGCTTTGTGAGCGGTCTCAGGAGCACCCTGGTCACCACACGTTCCCCACAGAGGAGG   |       |       |       |       |       |       |       |
| Trim5α H43Y  | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α V112F | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α R136Q | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α G249D | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α H419Y | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
|              | 410                                                                                 | 420   | 430   | 440   | 450   | 460   | 470   | 480   |
| Trim5α       | TTGCCCGGGAGTACCAAGTGAAGCTCCAGGCAGCTCTGGAGATGCTGAGGCAGAAGCAGCAGGAAGCTGAAGAGTTGGAA    |       |       |       |       |       |       |       |
| Trim5α H43Y  | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α V112F | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α R136Q | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α G249D | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α H419Y | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
|              | 490                                                                                 | 500   | 510   | 520   | 530   | 540   | 550   | 560   |
| Trim5α       | GCTGACATCAGAGAGAGAAAGCTTCTGGAAGACTCAAATACAGTATGACAAAACCAACGCTTTGGCAGATTTTGAGCA      |       |       |       |       |       |       |       |
| Trim5α H43Y  | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α V112F | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α R136Q | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α G249D | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |
| Trim5α H419Y | .....                                                                               | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... |

|              |                                                                                    |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
|              | 570                                                                                | 580  | 590  | 600  | 610  | 620  | 630  | 640  |
| Trim5a       | ACTGAGAGACATCCCTGGACTGGGAGGAGAGCAATGAGCTCCAAAACCTGGAGAAGGAGGAGGAAGACATTCTGAAAAGCC  |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 650                                                                                | 660  | 670  | 680  | 690  | 700  | 710  | 720  |
| Trim5a       | TTACGAACCTCTGAAACTGAGATGGTGCAGCAGACCCAGTCCCTGAGAGAGCTCATCTCAGATCTGGAGCATCGGCTGCAG  |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 730                                                                                | 740  | 750  | 760  | 770  | 780  | 790  | 800  |
| Trim5a       | GGGTCACTGATGGAGCTGCTTCAGGGTGTGGATGGCGTCATAAAAAGGACGGAGAACGTGACCTTGAAGAAAGCCAGAAAC  |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 810                                                                                | 820  | 830  | 840  | 850  | 860  | 870  | 880  |
| Trim5a       | TTTTCCAAAAAATCAAAGGAGAGTGTTCGAGCTCCTGATCTGAAAGGAATGCTAGAAGTGTTCAGAGAGCTGACAGATG    |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 890                                                                                | 900  | 910  | 920  | 930  | 940  | 950  | 960  |
| Trim5a       | TCCGACGCTACTGGGTTGATGTGACAGTGGCTCCAAACAACATTTTCATGTGCTGTTCATTTCTGAAGATAAGAGACAAGTG |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 970                                                                                | 980  | 990  | 1000 | 1010 | 1020 | 1030 | 1040 |
| Trim5a       | AGCTCTCCGAAACCACAGATAATATATGGGGCACGAGGGACAAAGATACCAGACATTTGTGAATTTCAATTATTGTACTGG  |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 1050                                                                               | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 | 1110 | 1120 |
| Trim5a       | CATCCTGGGCTCTCAAAGTATCACATCAGGGAAACATTACTGGGAGGTAGACGTGTCCAAGAAAACCTGCTTGGATCCTGG  |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
|              | 1130                                                                               | 1140 | 1150 | 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| Trim5a       | GGGTATGTGCTGGCTTCCAACCTGATGCAATGTGTAAATTTGAAAAAATGAAAAATTATCAACCTAAATACGGCTACTGG   |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |

|              |                                                                                    |      |      |      |      |      |      |      |  |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|--|
|              | 1210                                                                               | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 | 1260 | 1270 | 1280 |  |
| Trim5a       | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a       | GTTATAGGGTTAGAGGAAGGAGTTAAATGTAGTGCTTTCCAGGATAGTTCCCTTCCATACTCCTTCTGTTCCCTTTCATTGT |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
|              | 1290                                                                               | 1300 | 1310 | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 | 1360 |  |
| Trim5a       | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a       | GCCCCCTCTCTGTGATTATTTGTCCCTGATCGTGTGGAGTTTTCTAGACTATGAGGCTTGCACTGTCTCATTCTTCAATA   |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
|              | 1370                                                                               | 1380 | 1390 | 1400 | 1410 | 1420 | 1430 | 1440 |  |
| Trim5a       | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a       | TCACAAACCATGGATTCTCATCTATAAGTTTTCTCACTGTTCTTTTTCTCAGCCTGTATTTCCATATTTAAATCCTAGA    |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                              |      |      |      |      |      |      |      |  |
|              | 1450                                                                               | 1460 | 1470 | 1480 |      |      |      |      |  |
| Trim5a       | ..... ..... ..... .....                                                            |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a       | AAATGTGGAGTCCCCATGACTCTGTGCTCACCAAGCTCTTG                                          |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a H43Y  | ..... ..... ..... .....                                                            |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a V112F | ..... ..... ..... .....                                                            |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a R136Q | ..... ..... ..... .....                                                            |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a G249D | ..... ..... ..... .....                                                            |      |      |      |      |      |      |      |  |
| Trim5a H419Y | ..... ..... ..... .....                                                            |      |      |      |      |      |      |      |  |

