

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE
"AMEDEO AVOGADRO"**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

**DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE
- XVI CICLO -**

TESI DI DOTTORATO

**"RICERCA DI MOLECOLE ACCESSORIE
COINVOLTE NELL'INFEZIONE DA HIV-1"**

Relatore:

Prof. Umberto Dianzani

Coordinatore:

Prof. Umberto

Dianzani

Dottoranda:

Dott. Thea Bensi

ABBREVIAZIONI

ADCC	Citotossicità Cellulare Anticorpo Dipendente
ADPR	ADP-riboso
AICD	Activation-Induced Cell Death
AIDS	Acquired Immuno-Deficiency Syndrome
ALPS	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
APC	Antigen Presenting Cell
ASN	Soggetti HIV ⁺ asintomatici
cADPR	ADP-riboso ciclico
CDC	Centre for Disease Control
c-IAP1	cellular-Inductor of Apoptosis 1
c-IAP2	cellular-Inductor of Apoptosis 2
CRD	Cysteine Rich Domain
CTL	Linfocita T citotossico
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DALD	Dianzani's Autoimmune Lymphoproliferative Disease
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DLCL	Diffuse Large Cell-Lymphoma
DN	Linfociti T Doppi Negativi per CD4 e CD8
EBV	Epstein-Barr Virus
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FADD	Fas-Associated Death Domain

FLIP	FLICE Inhibitor Protein
FSC	Forward Scatter
GM-CSF	Granulocyte and Macrophage-Colony Stimulation Factor
HAART	Highly-Active Anti-Retroviral Therapy
HHV-8	Human Herpetic Virus 8
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1
IAP	Inhibitor Of Apoptosis
ICOS	Inducible Costimulator
IL-1	Interleuchina-1
IL-10	Interleuchina-10
IL-2	Interleuchina-2
IL-4	Interleuchina-4
IL-5	Interleuchina-5
IL-6	Interleuchina-6
IL-8	Interleuchina-8
INF-γ	Interferon γ
IP	Soggetti HIV ⁺ con Infezione Primaria
LT	Linfotossina
LTNP	Soggetti HIV ⁺ Long Term Non-Progressor
LTR	Long-Terminal Repeats
MBP	mannose binding protein
MBP	Multi Branched Peptide
MCP	Morte Cellulare Programmata
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulation Factor
MDM	Macrofagi di derivazione monocitaria

MOI	Multiplicity Of Infection
NF-kB	Nuclear Factor kB
NGF	Nerve Growth Factor
NHL	Non-Hodgkin Lymphoma
NP	Soggetti HIV ⁺ Non-Progressor
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed Death Gene-1
PD-L1	PD-1 Ligand 1
PD-L2	PD-1 Ligand 2
PDN	Metil-Prednisolone
PEG	Poli(Etilen-Glicol)
PR	Soggetti HIV ⁺ Progressor
RIP1	Receptor-Interacting Protein 1
SK	Sarcoma di Kaposi
SNCCCL	Small Non Cleaved-Cell Lymphoma
SSC	Size Scatter
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TAR	Trans-Acting Responsive element
TCR	T Cell Receptor
Th1	Linfocita T helper 1
Th2	Linfocita T helper 2
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNFR1	TNF Receptor 1
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α

TRADD	TNFR1-Associated Death Domain protein
TRAF1	TNFR-associated factor 1
TRAF2	TNFR-associated factor 2
TRAIL	TNF-Related-Apoptosis-Inducing Ligand
Treg	Linfociti T regularori
X-IAP	X-linked Inhibitor Of Apoptosis

INDICE

1. PREMESSA	<i>pag. 1 - 32</i>
1.1 Il retrovirus HIV	<i>pag. 1 - 9</i>
1.2 La sindrome da immunodeficienza acquisita	<i>pag. 10 - 15</i>
1.2.1 <i>Decorso clinico</i>	<i>pag. 10 - 12</i>
1.2.2 <i>AIDS e tumori</i>	<i>pag. 12 - 15</i>
1.3 Immunopatogenesi dell'infezione	<i>pag. 15 - 19</i>
1.3.1 <i>Meccanismi di sviluppo dell'immunodeficienza</i>	<i>pag 15 - 16</i>
1.3.2 <i>HIV e Citochine</i>	<i>pag 17 - 18</i>
1.3.3 <i>Co-recettori di HIV</i>	<i>pag 18 - 19</i>
1.4 Epidemiologia, Diagnosi, Terapia	<i>pag. 19 - 32</i>
1.4.1 <i>Epidemiologia</i>	<i>pag. 19 - 22</i>
1.4.2 <i>Diagnosi</i>	<i>pag. 23 - 24</i>
1.4.3 <i>Indagini sierologiche</i>	<i>pag. 24 - 28</i>
1.4.4 <i>Terapia</i>	<i>pag. 28 - 32</i>
2. SCOPO DEL LAVORO	<i>pag. 33-34</i>
3. RUOLO DELLA MOLECOLA COSTIMOLATORIA H4/ICOS NELL'EVOLUZIONE DELL'INFEZIONE DA HIV-1	<i>pag. 35 - 56</i>
3.1 Introduzione	<i>pag. 35 - 38</i>

3.1.1	<i>L'attivazione dei linfociti T</i>	<i>pag. 34 - 37</i>
3.1.2	<i>Ruolo di H4/ICOS nell'infezione da HIV</i>	<i>pag. 37 - 38</i>
3.2	<i>Scopo del lavoro</i>	<i>pag. 39</i>
3.3	<i>Materiali e Metodi</i>	<i>pag. 40 - 43</i>
3.3.1	<i>Pazienti HIV⁺</i>	<i>pag. 40</i>
3.3.2	<i>Anticorpi monoclonali ed analisi in immunofluorescenza</i>	<i>pag. 41</i>
3.3.3	<i>Analisi delle associazioni intermolecolari laterali: metodica del cocapping ed analisi mediante FRET</i>	<i>pag. 42 - 43</i>
3.3.4	<i>Saggio di morte cellulare</i>	<i>pag. 43</i>
3.4	<i>Risultati</i>	<i>pag. 44 - 53</i>
3.4.1	<i>Espressione della molecola H4/ICOS durante l'infezione da HIV-1</i>	<i>pag. 44 - 49</i>
3.4.2	<i>Correlazione funzionale tra la glicoproteina di HIV-1 gp120 e H4/ICOS</i>	<i>pag. 50 - 53</i>
3.5	<i>Discussione</i>	<i>pag. 54 - 56</i>

4. RUOLO DI FAS NELLA RITARDATA PROGRESSIONE DELL'IMMUNODEFICIENZA DA HIV-1

pag. 57 - 83

4.1	<i>Introduzione: Il sistema Fas</i>	<i>pag. 57 - 68</i>
4.1.1	<i>La superfamiglia dei recettori del TNF (TNFR)</i>	<i>pag. 57 - 58</i>
4.1.2	<i>Fas: struttura e suo ruolo nella cascata apoptotica</i>	<i>pag. 58 - 60</i>
4.1.3	<i>Inibitori del signaling di Fas</i>	<i>pag. 61</i>

4.1.4	<i>Difetti nella funzionalità di Fas: ALPS</i>	<i>pag. 62 - 63</i>
4.2	<i>Fas nell'infezione da HIV-1</i>	<i>pag. 63 - 66</i>
4.3	<i>Rallentata progressione dell'infezione da HIV-1 nei soggetti "Long Term non-progressor"</i>	<i>pag. 67</i>
4.4	<i>Scopo del lavoro</i>	<i>pag. 68</i>
4.5	<i>Materiali e Metodi</i>	<i>pag. 69 - 72</i>
4.5.1	<i>Pazienti</i>	<i>pag. 69</i>
4.5.2	<i>Cellule e analisi immunofenotipica</i>	<i>pag. 69 - 70</i>
4.5.3	<i>Saggio di Morte Cellulare</i>	<i>pag. 70 - 71</i>
4.5.4	<i>Fusione somatica</i>	<i>pag. 71</i>
4.5.4	<i>Analisi genica</i>	<i>pag. 72</i>
4.6	<i>Risultati</i>	<i>pag. 73 - 79</i>
4.6.1	<i>Ruolo di Fas nella progressione dell'infezione da HIV-1</i>	<i>pag. 73 - 79</i>
4.7	<i>Discussione</i>	<i>pag. 80 - 83</i>

5. LA MOLECOLA CD38 INTERFERISCE CON IL PROCESSO DI INFEZIONE DA HIV-1 MEDIANTE UNA SEQUENZA OMOLOGA AL LOOP V3 DI gp120

pag. 84 - 130

5.1	<i>Introduzione: La molecola CD38</i>	<i>pag. 84 - 88</i>
5.1.1	<i>CD38: una molecola multifunzionale</i>	<i>pag. 84 - 87</i>
5.1.2	<i>CD38 come marcatore di evoluzione della malattia da HIV</i>	<i>pag. 86 - 87</i>
5.2	<i>Scopo del lavoro</i>	<i>pag. 89</i>

5.3	<i>Materiali e Metodi</i>	<i>pag. 90 - 96</i>
5.3.1	<i>Costrutti e trasfettanti</i>	<i>pag. 90 - 91</i>
5.3.2	<i>FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)</i>	<i>pag. 91</i>
5.3.3	<i>Allineamenti di sequenze</i>	<i>pag. 91 - 92</i>
5.3.4	<i>Saggi di binding gp120/CD4</i>	<i>pag. 92</i>
5.3.5	<i>Linee Cellulari</i>	<i>pag. 92 - 93</i>
5.3.6	<i>Saggi Virologici</i>	<i>pag. 93 - 94</i>
5.3.7	<i>Saggi di proliferazione</i>	<i>pag. 94</i>
5.3.8	<i>Anticorpi Monoclonali</i>	<i>pag. 94</i>
5.3.9	<i>Analisi dell'attività spermicida</i>	<i>pag. 95 - 96</i>
5.3.10	<i>Valutazione delle Citochine</i>	<i>pag. 96</i>
5.4	<i>Risultati</i>	<i>pag. 97 - 124</i>
5.4.1	<i>Effetti di CD38 sul processo di fusione virale</i>	<i>pag. 97 - 102</i>
5.4.2	<i>Mappatura del dominio di CD38 coinvolto nell'inibizione dell'HIV-1</i>	<i>pag. 102 - 103</i>
5.4.3	<i>Allineamenti tra le sequenze di CD38 e di gp120 di HIV-1</i>	<i>pag. 104 - 105</i>
5.4.4	<i>Effetti dei peptidi sintetici derivati da CD38 sulla replicazione di HIV-1</i>	<i>pag. 106 - 109</i>
5.4.5	<i>Effetto anti-HIV di una forma ramificata del peptide sCD38₅₁₋₇₄</i>	<i>pag. 110 - 112</i>
5.4.6	<i>Coinvolgimento del dominio GPGTTK negli effetti anti-HIV-1 di CD38 ed interazione gp120/CD4</i>	<i>pag. 113 - 115</i>
5.4.7	<i>Valutazione della tossicità di sCD38₅₁₋₇₄MBP</i>	<i>pag. 116 - 117</i>

5.4.8 *Valutazione dell'attivazione linfo/monocitaria indotta da sCD38₅₁₋₇₄MBP
sui PBMC* *pag. 118 - 122*

5.4.9 *Valutazione della attività spermicida di sCD38₅₁₋₇₄MBP*
pag. 123 - 124

5.4 *Discussione* *pag. 125 - 130*

6. BIBLIOGRAFIA *pag. 131 - 156*

1. PREMESSA

1.1 Il retrovirus HIV

L'HIV è un retrovirus, cioè un virus ad RNA capace di realizzare la "trascrizione inversa" dell'RNA in cDNA grazie all'enzima trascrittasi inversa [1]. L'RNA virale è contenuto in un "core" proteico con i due enzimi necessari per le prime fasi dell'infezione, la trascrittasi inversa e l'integrasi. Il "core" virale è circondato da un involucro lipidico derivato dalla membrana della cellula infettata da cui è gemmato il virione. A livello dell'involucro sono espresse due glicoproteine virali, gp41 transmembrana e gp120 associata alla prima in modo non covalente; queste sono sintetizzate dal precursore comune gp160 (160 kDa) [2, 3].

Il virus utilizza come principale recettore sulle cellule umane CD4, cui si lega tramite gp120; HIV infetta in via preferenziale le cellule che esprimono questa molecola, cioè linfociti T helper, macrofagi e cellule dendritiche (**Fig. 1**).

L'interazione gp120/CD4 induce l'associazione laterale a CD4 di alcune molecole di superficie del linfocita T, tra cui CD38, CD59, CD26, CXCR4 [4, 5] (**Fig. 2**).

La fase d'adsorbimento del virus HIV-1 si basa su un complesso sistema d'interazioni molecolari tra virus e cellula, ma i meccanismi molecolari coinvolti non sono ancora compresi del tutto. Tra i differenti domini di gp120 deputati al riconoscimento di target cellulari, il primo ad essere interessato è il cosiddetto *CD4-binding site* che lega CD4.

Questo legame comporta un cambiamento conformazionale tale per cui risultano esposti il *CoR-binding site*, con cui gp120 interagisce con i recettori chemochinici e i glicosaminoglicani, ed il dominio fusogenico di gp41, responsabile della fusione tra le membrane della cellula ospite e dell'involucro virale (**Fig. 3**). E' stato inoltre proposto

che l'ansa V3 di gp120 garantisca la stabilizzazione del legame CD4/gp120, tramite un'interazione secondaria con recettori chemochinici e glicosaminoglicani [6].

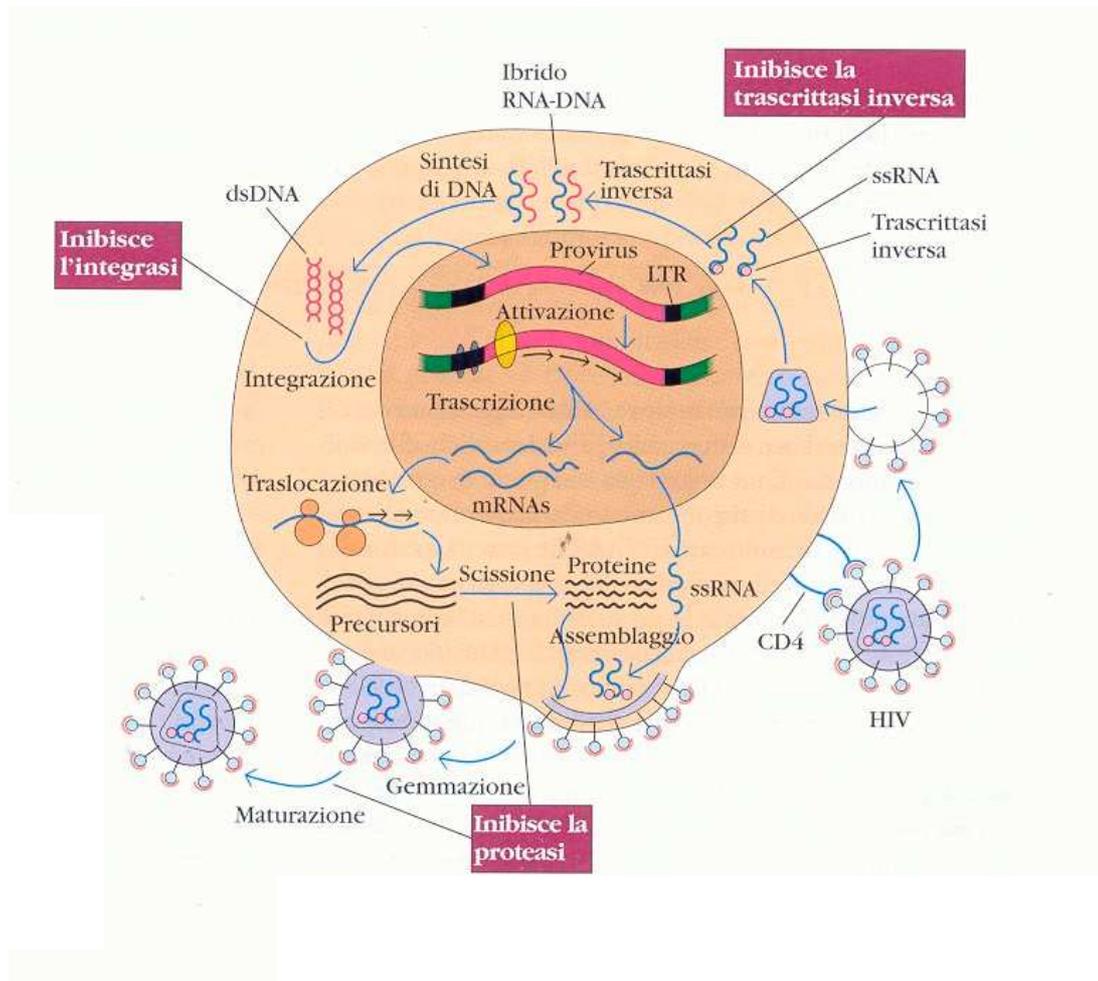


Fig. 1 Ingresso dell'HIV-1 nella cellula ed integrazione del DNA virale. Il legame di gp120 a CD4, è seguito dalla fusione delle membrane, che permette l'ingresso nella cellula del core virale contenente il genoma virale. Le proteine del core sono rimosse e rilasciano il ssRNA e la trascrittasi inversa, che copia il ssRNA dando origine a ibridi RNA-DNA. Lo stampo originale di RNA è parzialmente degradato dalla ribonucleasi H ed inizia la sintesi del secondo filamento di DNA. Il dsDNA virale così prodotto si integra nel DNA cromosomico dell'ospite per opera dell'enzima virale integrasi.

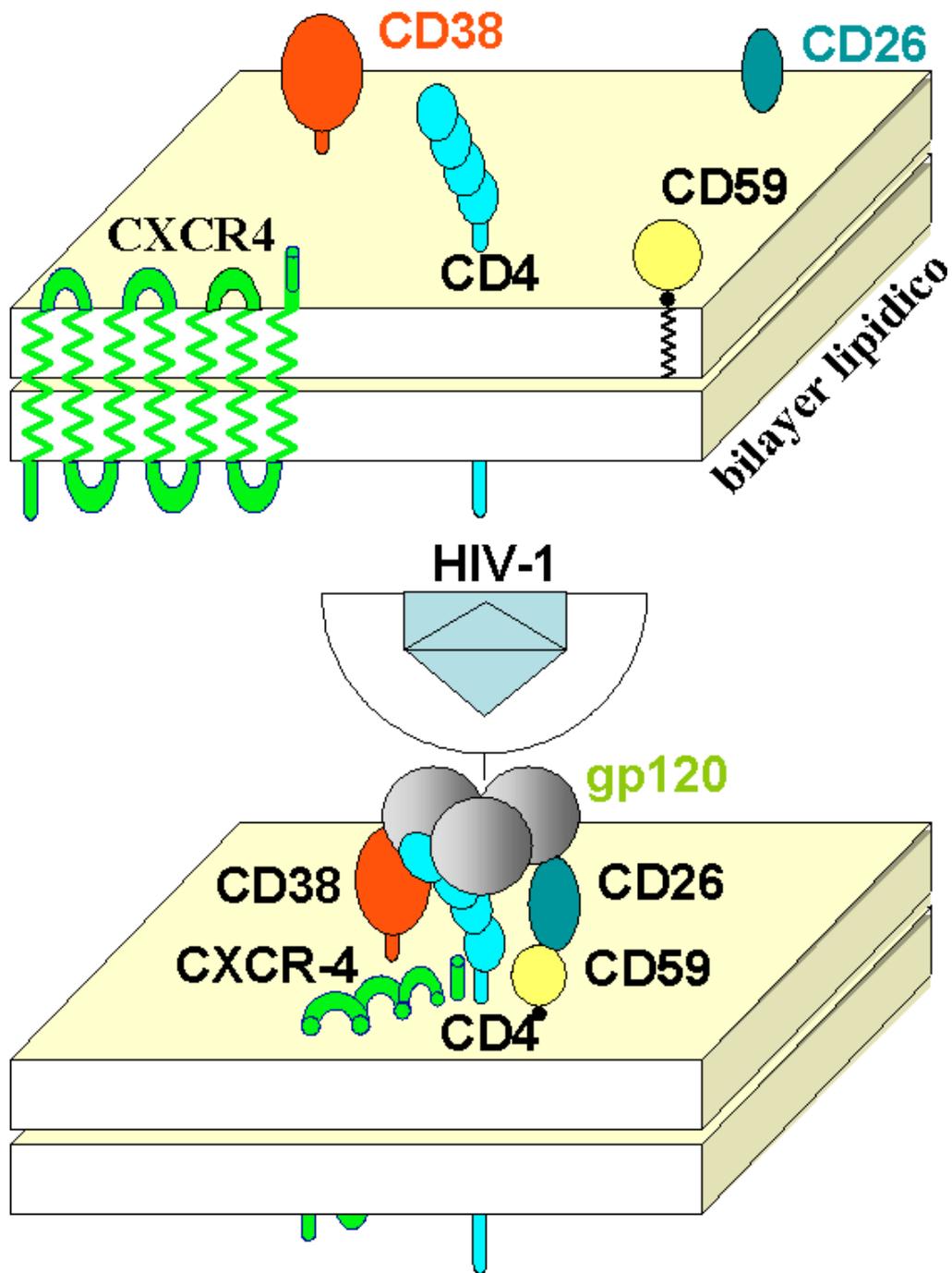


Fig. 2 Associazioni laterali indotte dalla gp120 di HIV-1 sulla superficie cellulare. L'attacco virale coinvolge l'interazione della glicoproteina virale gp120 con CD4, che agisce come principale recettore sulla superficie cellulare. gp120 legata a CD4 interagisce poi con vari membri della famiglia dei recettori delle chemochine, i quali agiscono come corecettori del virus.

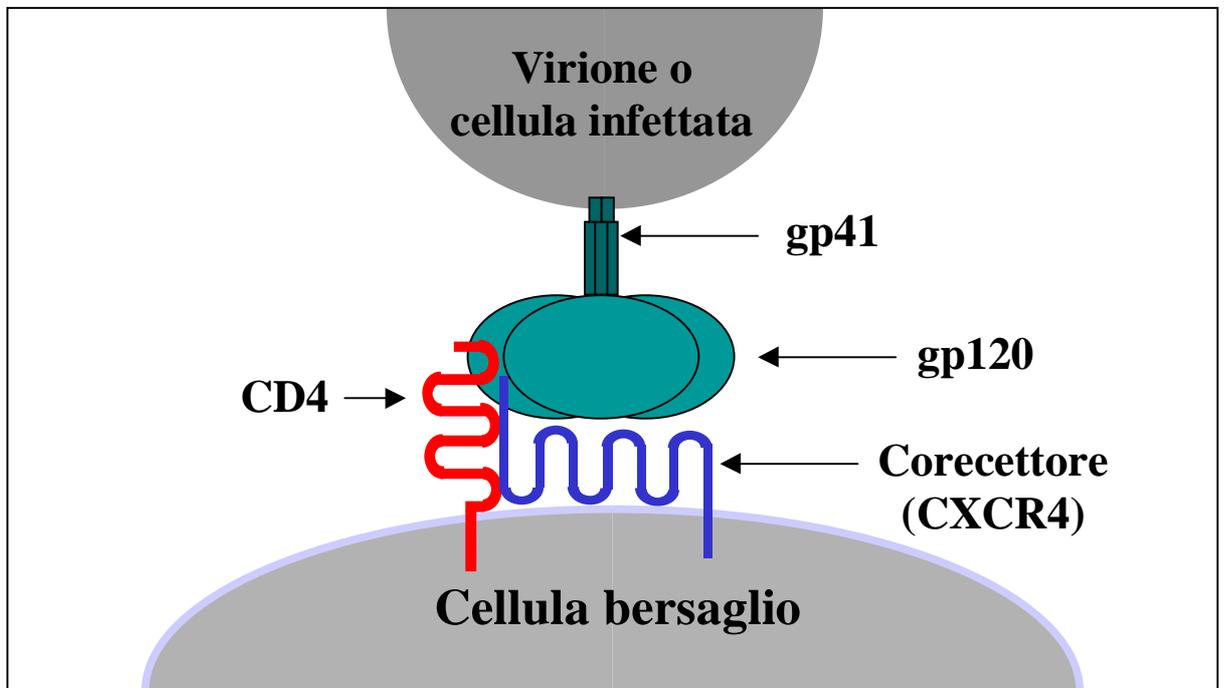


Fig. 3 L'attacco virale coinvolge l'interazione della glicoproteina gp120 virale con CD4, che agisce come principale recettore virale sulla cellula. Il complesso gp120/CD4 può, però, stabilire anche interazioni a bassa affinità con altre molecole di superficie. Queste interazioni potrebbero svolgere un ruolo nell'ingresso del virus nella cellula o nelle alterazioni che il virus induce nei linfociti. Infatti, gp120 induce l'associazione del CD4 con altre molecole di adesione e modifica l'adesività dei linfociti all'endotelio vascolare *in vitro* ed il loro *homing* in vivo. Queste associazioni laterali indotte da gp120 potrebbero modulare l'interazione virus/cellula e quindi anche influenzare la suscettibilità cellulare all'infezione.

Successivamente si ha l'interazione di gp120 con il recettore chemochinico [7, 8], e l'inserimento nella membrana della cellula bersaglio dell'NH₂-terminale del dominio fusogenico di gp41.

Infine, gp41 assume una particolare conformazione detta *6-helix bundle* la cui formazione è accompagnata dalla fusione delle membrane [9].

A questo punto il capsido proteico è libero di diffondere nel citoplasma della cellula ospite, e, in seguito alla sua disgregazione, si ha la retrotrascrizione dell'RNA virale [3].

L'RNA virale è retrotrascritto in cDNA dalla trascrittasi inversa, e l'integrasi virale ne catalizza l'inserimento nel DNA cromosomico della cellula ospite. Il DNA virale rimane così permanentemente associato al DNA della cellula ospite, ed, in seguito a divisione cellulare, è trasmesso a tutte le cellule figlie; nello stato di latenza i geni virali non sono espressi ed il provirus rimane così nascosto al sistema immunitario.

Lo stato di latenza nelle cellule ospiti del provirus dell'HIV perdura finché determinati eventi ne innescano l'attivazione, inducendo l'espressione dei geni strutturali del virus.

Le proteine virali possono quindi assemblarsi nel citoplasma cellulare al fine di formare il "core" proteico, mentre gp41 e gp120 si vanno ad inserire nelle zone di membrana in cui avverrà la gemmazione con la formazione dell'involucro. In alcuni casi questo processo porta alla lisi della cellula infettata, in altri, invece, questa sopravvive.

gp120 espressa sulla superficie della cellula ospite interagisce con CD4 presente sulla stessa membrana, e se il livello d'espressione di CD4 è elevato, un processo d'autofusione può compromettere l'integrità della membrana e portare alla lisi cellulare.

Un livello d'espressione di CD4 basso, viceversa, fa sì che la gemmazione di HIV e la conseguente autofusione non producano un esteso danno alla membrana, per cui la

cellula sopravvive. Il destino della cellula in seguito all'infezione è quindi influenzato dal livello d'espressione di CD4.

Il genoma di HIV può essere letto secondo tre cornici di lettura che consentono la codifica di geni sovrapposti [10] (Fig. 4).

Struttura del genoma dell'HIV-1

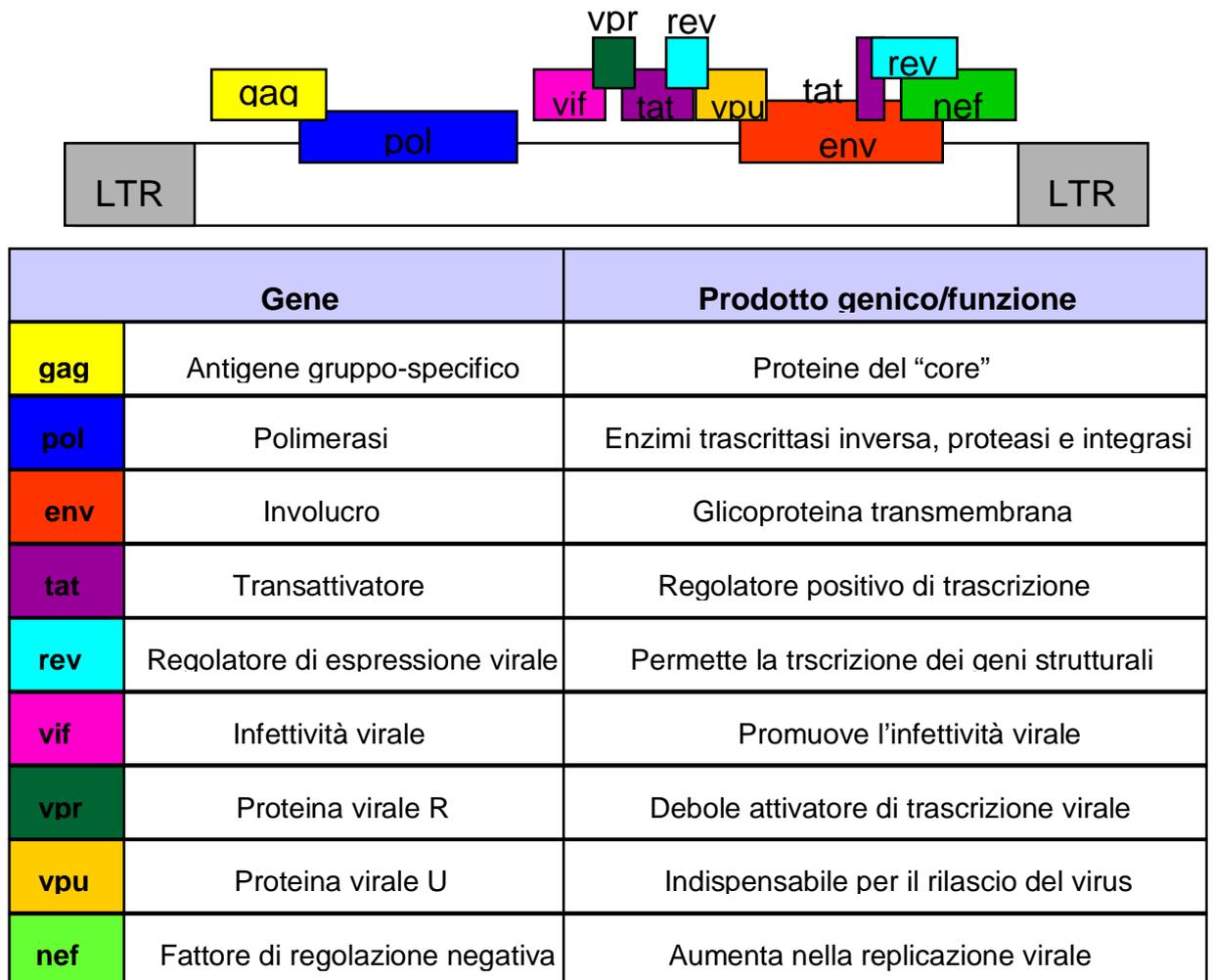


Fig. 4 Organizzazione genetica dell'HIV-1. I tre geni principali (*gag*, *pol* e *env*) codificano per poliproteine, che sono poi scisse per produrre le proteine del *core* virale. I geni *tat*, *rev* e *nef* codificano per proteine regolatrici che svolgono un ruolo chiave nel controllo dell'espressione del virus; i geni *vif* e *vpu* codificano per proteine richieste per la maturazione del virione; *vpr* codifica per un attivatore trascrizionale debole. Le sequenze codificanti dei diversi geni sono in parte sovrapposte. Una processazione differenziale del trascritto primario dell'RNA e una traduzione degli mRNA risultanti utilizzando diverse cornici di lettura porta alla produzione dei diversi prodotti genici. Sia *tat* che *rev* sono geni interrotti: i vari esoni che li compongono sono riuniti durante la fase di processazione dell'RNA e portano alla sintesi di Tat o Rev a seconda della cornice di lettura utilizzata durante la traduzione dell'mRNA.

La parte codificante del virus è fiancheggiata alle due estremità da sequenze terminali ripetute lunghe (LTR, *long-terminal repeats*), necessarie per l'integrazione nel genoma dell'ospite. L'LTR in posizione 5' contiene sequenze *enhancer* e *promoter* essenziali per la trascrizione genica; l'LTR in posizione 3' è invece necessario per la poliadenilazione dei trascritti di RNA.

Il genoma di HIV, come tutti i retrovirus, contiene i geni *gag*, *env* e *pol*, che codificano rispettivamente per le proteine del core, le glicoproteine dell'involucro e le proteine non strutturali necessarie per la replicazione virale.

I geni *gag* e *pol* codificano per grandi poliproteine che sono scisse da una proteasi virale in unità strutturali. La poliproteina codificata da *pol* genera così tre enzimi: trascrittasi inversa, proteasi ed integrasi. La poliproteina codificata da *gag* è scissa in quattro proteine: p24, p7, p9 e p17. La p17 e la p24 costituiscono il core della particella virale [11].

Il gene *env* codifica per il precursore gp160, che è scisso da una proteasi della cellula ospite, producendo gp120 e gp41.

Oltre ai tre geni principali (*gag*, *env* e *pol*), il genoma virale dell'HIV comprende altri sei geni: il fattore di infettività virale (*vif*), il gene per la proteina virale R (*vpr*), il transattivatore (*tat*), il regolatore dell'espressione delle proteine virali (*rev*), il fattore di regolazione negativa (*nef*) e il gene per la proteina virale U (*vpu*). Tre di questi geni: *tat*, *rev* e *nef* codificano proteine regolatrici che controllano l'espressione dei geni strutturali *gag*, *pol* ed *env*; *tat* e *rev* sono geni interrotti, letti sul poliribosoma utilizzando diverse cornici di lettura, in modo da generare il prodotto genico di *tat* oppure quello di *rev*.

Il prodotto di *tat* è una piccola proteina di 86 aminoacidi detta Tat, questa attiva l'espressione del provirus interagendo con una corta sequenza di RNA, detta TAR,

localizzata all'estremità 5' terminale di tutti i trascritti, a valle rispetto al sito di inizio della trascrizione. La sequenza TAR (trans-acting responsive element), forma una protrusione ad ansa di 59 nucleotidi che, interagendo con Tat, favorisce l'inizio della trascrizione e stabilizza il complesso formato con l'RNA polimerasi mentre questa scorre lungo il DNA del provirus; la trascrizione non si interrompe così prematuramente.

Le prime proteine virali che compaiono in seguito alla trascrizione del DNA del provirus sono le proteine regolatrici Tat, Rev e Nef. Successivamente si osserva uno spostamento verso l'espressione dei geni per le proteine strutturali ed enzimatiche codificate da *gag*, *env* e *pol*. La trascrizione del DNA del provirus in RNA ed mRNA è catalizzata dalla RNA polimerasi dell'ospite, che riconosce il promotore situato nell'LTR in posizione 5'. Il promotore è relativamente debole ed ha una bassa affinità per la RNA polimerasi. Per questo motivo si generano trascritti corti e tronchi; il trascritto completo di HIV può essere ottenuto solo quando questo promotore debole è convertito in una forma pienamente attiva. Vari fattori possono mediare questa conversione, come ad esempio il legame di Tat all'elemento TAR del trascritto emergente, o un fattore di trascrizione come NF-kB della cellula ospite. L'attivazione dei linfociti T da parte dell'antigene induce la produzione di vari fattori di trascrizione, tra cui NF-kB che promuove l'espressione del gene dell'interleuchina 2 (IL-2). Pertanto l'attivazione di un linfocita T infettato da parte dell'antigene, provoca un incremento della produzione di NF-kB, che, oltre a stimolare l'espressione dell'IL-2 e del suo recettore, stimola anche l'espressione delle proteine di HIV.

Caratteristica importante dell'HIV è la variabilità genetica, ossia il virus muta rapidamente nell'ospite variando la struttura dei suoi antigeni di superficie. Le maggiori variazioni si trovano sul principale antigene di superficie del virus, la gp120. Sulla base

della frequenza di mutazioni nei diversi isolati virali questa molecola è stata suddivisa in 5 regioni (domini) ipervariabili (V1-V5) che si alternano ad altrettante regioni maggiormente conservate (C1-C5) (**Fig. 5**). Il sito di legame per CD4 si trova vicino all'ansa V3, in una regione fortemente conservata. La maggior parte degli anticorpi in grado di neutralizzare l'infezione da parte di HIV riconoscono l'ansa V3, detta anche *principale determinante di neutralizzazione* [12].

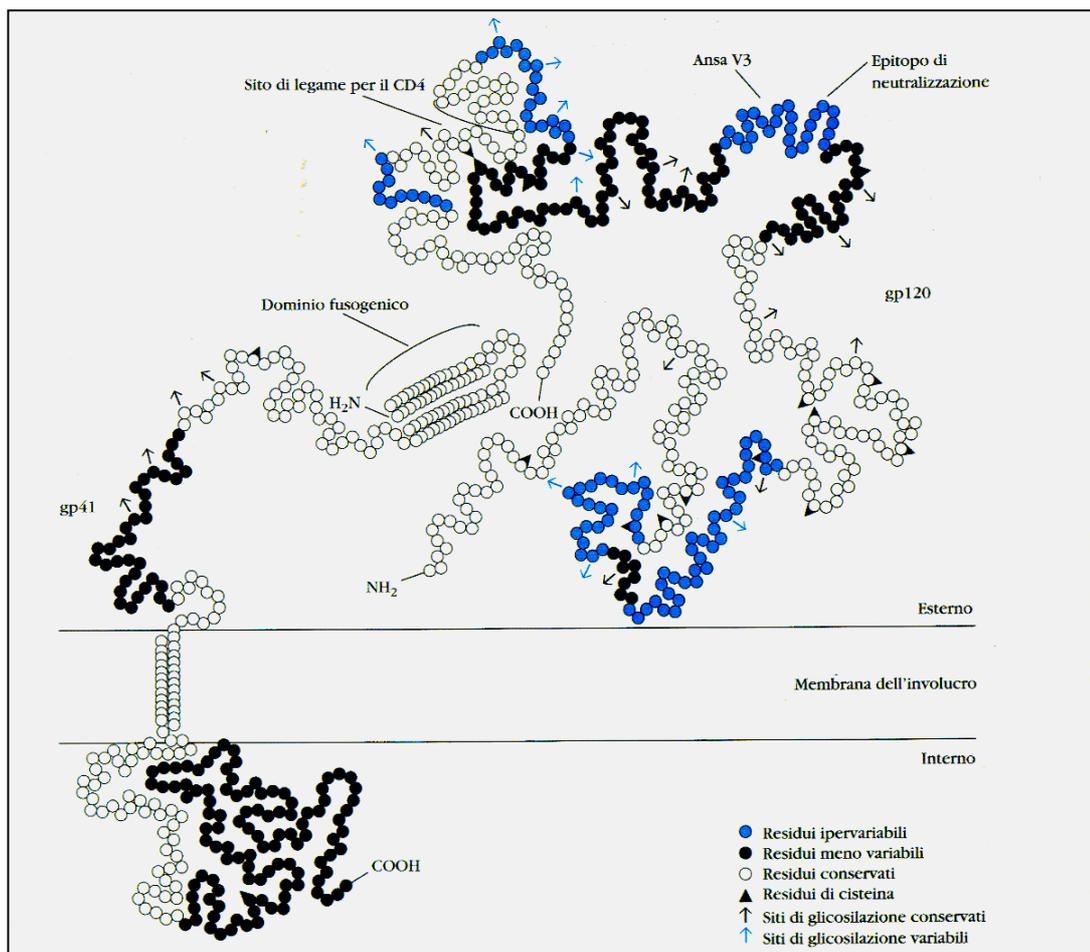


Fig. 5 Rappresentazione schematica della glicoproteina gp120 dell'involucro di HIV-1. La figura mette in evidenza i residui amminoacidici ipervariabili (azzurro), quelli meno variabili (nero) e quelli conservati (bianco). Gli anticorpi neutralizzanti riconoscono in genere un epitopo che corrisponde alla regione ipervariabile denominata V3. Notare che il sito di legame per CD4 su gp120 e il dominio fusogenico su gp41, entrambi fondamentali per la funzione del virus, sono composti da sequenze conservate.

1.2 La sindrome da immunodeficienza acquisita

1.2.1 Decorso clinico

Successivamente all'integrazione del provirus nella cellula ospite si determina nel paziente una prima fase di infezione virale acuta della durata di alcune settimane. In questa fase l'HIV infetta e uccide un elevato numero di linfociti T CD4⁺; il numero di queste cellule in circolo si riduce bruscamente mentre è liberato un gran numero di particelle virali. Successivamente il sistema immunitario risponde al virus con anticorpi, linfociti T CD4⁺ helper (di tipo Th1 e Th2) e linfociti T CD8⁺ citotossici eliminando efficacemente il virus dal circolo. Il soggetto infetto entra quindi nella fase asintomatica della malattia, nella quale il numero di linfociti T CD4⁺ del sangue periferico torna a livelli normali. In questa fase solo una piccola parte dei linfociti CD4⁺ periferici sono infettati e questi per lo più contengono una singola copia di genoma virale in stato di latenza. In realtà, anche in questa fase, la malattia progredisce, anche se in modo inapparente, in quanto il virus si concentra nei centri germinativi dei linfonodi sulla superficie delle cellule follicolari dendritiche dove riesce a entrare in contatto con i numerosi linfociti T CD4⁺ che entrano nel centro germinativo [13]. In questo modo si produce un'infezione cronica che riduce gradualmente il numero di linfociti T CD4⁺, distrugge progressivamente le cellule follicolari dendritiche e porta a un graduale sovvertimento della normale architettura dei linfonodi. Durante questa fase, il sistema immunitario è attivato cronicamente e porta a ipergammaglobulinemia ed alla liberazione in circolo di livelli elevati di citochine. La graduale riduzione del numero dei linfociti T CD4⁺, la progressiva distruzione dell'architettura dei linfonodi, delle APC professioniste (cellule dendritiche e macrofagi), e della rete delle cellule follicolari dendritiche porta a una progressiva erosione della reattività del sistema immunitario, fino alla comparsa dell'ultima fase della malattia, l'AIDS conclamato.

L'AIDS sopravviene quando il numero di linfociti T CD4⁺ scende al di sotto di 200 cellule/μl di sangue, evoluzione che può richiedere tra 2 e 10 anni (**Fig. 6**).

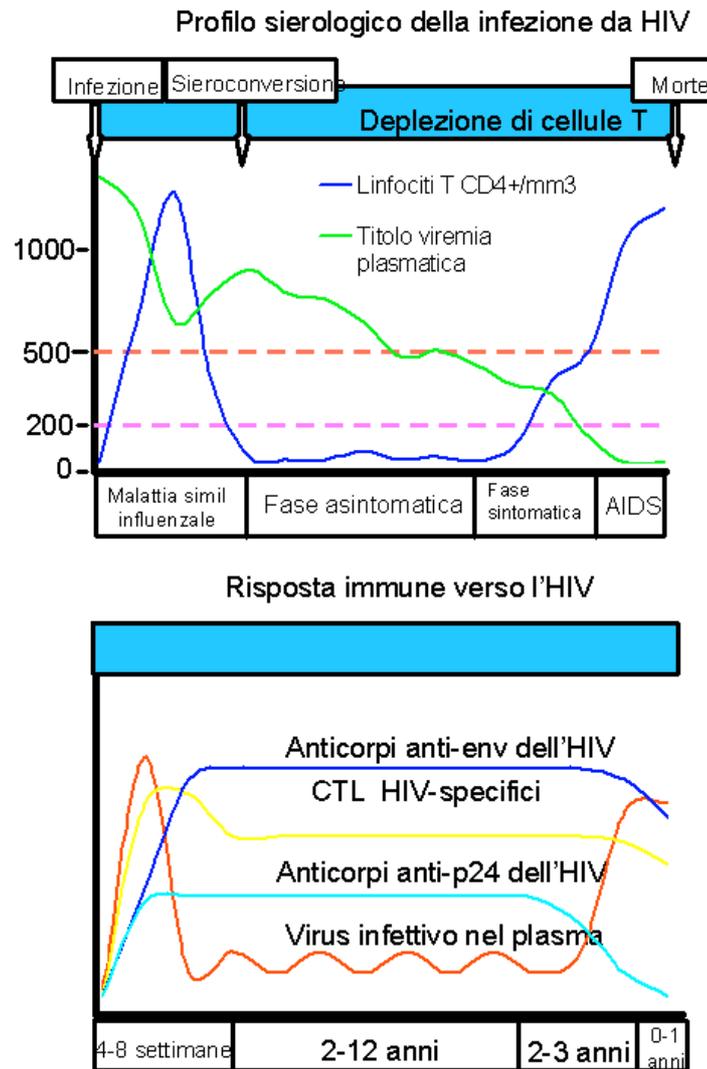


Fig. 6 Tipico decorso dell'infezione da HIV-1. La prima settimana è caratterizzata da una malattia simil-influenzale acuta; talvolta la malattia induce sieroconversione con un alto titolo virale nel sangue. Segue una risposta immune adatta che controlla la malattia acuta, ma non eradica il virus. Il virus infettivo è presente a basso livello nel sangue periferico per una fase asintomatica prolungata, ma persiste nel tessuto linfoide. Durante questo periodo il numero delle cellule CD4⁺ si riduce gradualmente, sebbene la risposta immunitaria rimanga ad alto livello. Le risposte di due differenti anticorpi sono mostrate in figura, uno contro la proteina del nucleocapside dell'HIV-1, env, e l'altro contro la proteina del core p24. Le infezioni opportunistiche ed altri sintomi diventano frequenti quando il numero dei linfociti T CD4⁺ diventa <500/μl; quando il numero dei CD4⁺ scende a 200/μl, il paziente va incontro alla fase di AIDS conclamato. A questo punto, i livelli di anticorpi ed il numero dei linfociti citotossici HIV-specifici riappaiono nel sangue periferico.

Circa il 20-30% dei bambini, nati da madri infette con HIV, sono infettati dal virus, il quale può attraversare la placenta o essere trasmesso attraverso il sangue durante il parto; molti bambini muoiono entro due anni dalla nascita.

La sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) è caratterizzata da uno stato d'immunodepressione con maggior suscettibilità ad infezioni opportunistiche, e sviluppo d'alcune neoplasie. I microrganismi responsabili delle infezioni opportunistiche, normalmente controllati dall'immunità cellulo-mediata, sono: *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, *Cytomegalovirus* e micobatteri.

Il 15-20% dei pazienti affetti da AIDS soffre anche d'infezioni da patogeni come l'*Haemophilus influenzae*, normalmente controllati dall'immunità umorale.

1.2.2 AIDS e tumori

I tumori che più frequentemente si riscontrano nei pazienti con AIDS sono il Sarcoma di Kaposi e i linfomi non-Hodgkin (NHL) a cellule B.

I NHL si sviluppano in circa il 2-10% dei soggetti HIV-1 infetti e sono istologicamente eterogenei [14]. Si differenziano dai NHL presenti in individui immunocompetenti in quanto coinvolgono spesso sedi extralinfonodali e interessano il sistema nervoso centrale in un numero significativo di casi. Questi NHL sono stati raggruppati in due categorie: linfomi a piccole cellule non indentate (Small Non Cleaved-Cell Lymphoma, SNCCL) e linfomi diffusi a grandi cellule (Diffuse Large Cell-Lymphoma, DLCL) [14, 15].

Il Sarcoma di Kaposi (SK) è il risultato di un processo angioproliferativo, multicentrico, caratterizzato dalla neoproduzione di capillari e di cellule connettivali, che interessa principalmente la cute, ma che può manifestarsi anche a livello di mucose e di organi interni.

Esistono quattro forme cliniche di SK: classico o mediterraneo, endemico o africano, iatrogeno (da immunosoppressione farmacologica), epidemico (legato all'AIDS).

HIV può favorire la tumorigenesi attraverso l'immunodeficienza oppure attraverso effetti diretti o indiretti del virus.

i. Immunodeficienza

L'immunodeficienza conseguente all'infezione da HIV è determinante nella genesi dei tumori citati, come comprovato dalla significativa associazione tra basso numero di linfociti T CD4⁺ e sviluppo di neoplasie [17], ma la patogenesi dei tumori associati ad AIDS ed eventuale ruolo del virus sono ancora argomenti di discussione. Il frequente ritrovamento di sequenze di virus a DNA nelle cellule maligne (rispettivamente virus di Epstein Barr (EBV) nei linfomi non Hodgkin [(NHL) e virus erpetico di tipo 8 (HHV-8) nei Sarcomi di Kaposi]) [18, 19] ha fatto supporre che questi agenti siano direttamente coinvolti nella tumorigenesi associata alla infezione da HIV. Un ruolo diretto di HIV appare improbabile in questi tumori, dato che il virus non è in genere presente nelle cellule neoplastiche.

ii. Effetto indiretto del virus

Una serie di osservazioni suggeriscono che HIV possa contribuire all'oncogenesi anche con meccanismi diversi dall'immunodeficienza; la comparsa dei tumori non sempre correla con lo stato di immunodepressione, e l'incidenza di alcuni tumori, tra cui il linfoma di Burkitt o il linfoma a grandi cellule EBV-negativo, è maggiore nei soggetti infettati da HIV rispetto a soggetti immunodepressi in seguito a immunosoppressione farmacologica. L'azione di HIV potrebbe essere mediata da citochine o proteine virali secrete da poche cellule infettate da HIV ed essere in grado di favorire il processo di

trasformazione cellulare di linfociti vicini. Un ruolo di questo genere è stato proposto per la proteina Tat, per i numerosi effetti sulla crescita e sul metabolismo cellulare. Un modello proposto per spiegare gli effetti di Tat sulle cellule bersaglio prevede due diversi meccanismi: 1) Tat extracellulare interagisce con recettori di superficie determinando l'attivazione di segnali che inducono la proliferazione cellulare; 2) Tat nucleare può interagire con promotori e portare alla transattivazione di geni cellulari e virali [20]. In modelli in vitro la proteina Tat rilasciata dalle cellule è in grado di mantenere la sua capacità transattivante dopo essere stata internalizzata per endocitosi [15]. L'evidenza che in pazienti con AIDS siano riscontrabili livelli misurabili di anticorpi anti-Tat dimostra che questa è presente a livello extracellulare. Tat extracellulare presente a basse concentrazioni ha un effetto positivo sull'attività della protein chinasi C [16], una serina-treonina chinasi coinvolta nella trasduzione di segnali di attivazione in molti tipi cellulari, inclusi i linfociti T. E' stato inoltre dimostrato che Tat agisce attivando NF- κ B (attivatore trascrizionale ubiquitario inducibile che agisce su un gran numero di promotori cellulari e virali) e questo potrebbe spiegare il suo effetto diretto o indiretto, ovvero mediato dal rilascio di citochine, sulla sopravvivenza e proliferazione di differenti tipi cellulari. Tat potrebbe quindi essere coinvolta nella proliferazione policlonale che anticipa la trasformazione neoplastica nei linfomi associati a HIV [21, 22].

iii. Effetto diretto del virus

La maggior parte di linfomi associati all'infezione da HIV deriva dai linfociti B, cellule non infettate da HIV, e sarebbe legata all'immunodeficienza che permetterebbe l'attivazione di virus oncogeni diversi da HIV. Tuttavia è anche stato osservato un numero crescente di tumori a carico dei linfociti T o a fenotipo misto.

Quest'osservazione permette di avanzare l'ipotesi che in certi casi HIV possa avere un coinvolgimento diretto nella trasformazione neoplastica della cellula infettata. In linea con questa possibilità in uno studio condotto su quattro di questi tumori che presentavano un alto grado d'espressione di p24 mediante analisi immunocitochimiche, è stata rivelata l'integrazione monoclonale delle sequenze provirali in un sito adiacente al proto-oncogene *c-fps/fes* [23], in precedenza associato a patologie tumorali linfoidi e mieloidi ed espresso nelle cellule di Reed-Sternberg dei linfomi Hodgkin. Queste osservazioni, suggeriscono che HIV potrebbe contribuire a regolare direttamente il processo di linfomagenesi causando la trasformazione cellulare in questo tipo di linfomi con meccanismi analoghi ai virus cronicamente trasformanti.

1.3 Immunopatogenesi dell'infezione

1.3.1 Meccanismi di sviluppo dell'immunodeficienza

Un evento chiave nella patogenesi dell'immunodeficienza indotta da HIV, è l'interazione della glicoproteina dell'involucro virale gp120 con il suo recettore specifico ad alta affinità CD4 [24, 25]. Quest'interazione è cruciale per i processi di propagazione del virus, legati all'infezione cellulare ed alla formazione di sincizi tra cellule infettate e sane, e ne condiziona il tropismo tissutale. E' attualmente a disposizione una notevole mole di dati riguardanti la biologia molecolare del virus, ma restano ancora oscuri molti aspetti della patogenesi della malattia. Il contrasto esistente tra la gravità dell'immunodeficienza (e della deplezione di linfociti CD4⁺) e l'esiguità del numero di cellule infettate dal virus nella fase asintomatica della malattia suggerisce che l'infezione ed il suo effetto citopatico sulle cellule CD4⁺ non siano l'unica causa dell'immunodeficienza. Quest'idea è avvalorata dall'osservazione che in alcuni modelli animali l'infezione cellulare non si associa a malattia evidente [26, 27].

La ricerca di meccanismi alternativi che producano l'immunodeficienza ha portato all'identificazione di una serie di azioni del virus sul sistema immunitario indipendenti dalla sua attività citopatica diretta sui linfociti CD4⁺ [24].

Alcuni dei meccanismi possibili sono:

- l'interazione del virus o della gp120 liberata dal virus con la cellula può innescare l'inattivazione di linfociti T non infettati con induzione di anergia o morte cellulare programmata (MCP);

- gp120 può inibire il riconoscimento dell'antigene legando un sito del CD4 coinvolto nell'interazione con molecole MHC II;

- il virus può innescare fenomeni di autopatotoxicità contro cellule non infettate. Queste, infatti, possono interagire con immunocomplessi contenenti la gp120 e diventare così bersaglio di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), oppure possono endocitare la glicoproteina virale, processarla, presentarla in superficie e diventare così bersaglio di linfociti T CD4⁺ citotossici (CTL). E' stato anche proposto che gp120 possa attivare i linfociti T direttamente, funzionando da superantigene, oppure mimando molecole MHC allogeniche, e possa così innescare fenomeni tipo "graft versus host disease";

- l'infezione di cellule accessorie professioniste può inibire la corretta processazione degli antigeni ed una presentazione inappropriata può innescare delezione clonale dei linfociti T;

- e' stato dimostrato che HIV danneggia il microambiente timico, e, nonostante il ruolo del timo nell'adulto non sia chiaro, è stato ipotizzato che, in condizioni di deplezione dei linfociti T CD4⁺, la funzione di sostituzione delle cellule mancanti da parte del timo diventi importante.

1.3.2 HIV e Citochine

Le citochine giocano un ruolo importante nel controllo dell'omeostasi del sistema immunitario e sia l'infezione che la replicazione da HIV sono continuamente regolate da una complessa rete di citochine prodotte da cellule diverse. Durante il corso dell'infezione la secrezione di citochine da parte dei linfociti Th1 (responsabili dell'immunità cellulo-mediata), quali IL-2 e IFN- γ , è generalmente ridotta laddove la produzione di citochine da parte dei linfociti Th2 (responsabili dell'attivazione dell'immunità umorale), quali IL-4, IL-10 e citochine proinfiammatorie quali IL-1, IL-6, IL-8 TNF- α , risulta aumentata. Numerose citochine sono coinvolte nella modulazione dell'infezione e della replicazione in vitro sia in linfociti T CD4⁺ sia in cellule della linea macrofagica. Gli effetti di queste citochine possono essere inibitori, stimolatori o bifunzionali (cioè sia inibitori che stimolatori).

Le citochine stimolanti includono: TNF- α , TNF- β , IL-1 e IL-6 le quali promuovono la replicazione di HIV-1 nelle cellule T e nei macrofagi di derivazione monocitaria (MDM); IL-2, IL-7 e IL-15 regolano positivamente la replicazione in cellule T e il fattore stimolante le colonie macrofagiche (M-CSF) la regola positivamente nei MDM.

Le citochine inibenti includono: IFN- α , IFN- β e IL-16 per quanto riguarda i linfociti T e MDM; IL-10 e IL-13 per quanto concerne i soli MDM.

Alle citochine bifunzionali appartengono IFN- γ , IL-4 e il fattore stimolante le colonie macrofagiche e granulocitiche (GM-CSF) che mostrano effetti sia stimolanti che inibenti .

Particolare importanza deve essere inoltre data alle β -chemochine secrete da diversi tipi cellulari quali monociti/macrofagi, linfociti T, fibroblasti, mastociti e responsabili della chemiotassi linfocitaria, dell'infiammazione e dell'ematopoiesi. In particolare tre di queste β -chemochine quali CCL3, CCL4 e CCL5 sono state identificate come ligandi

naturali per CCR5 e sono considerate importanti inibitori dei ceppi macrofagici tropici (M-tropici) di HIV-1 [28]; l' α -chemochina CXCL12, invece, si lega al suo ligando CXCR4 ed è considerata un importante soppressore dell'infezione dei ceppi linfocito tropici (T-tropici) [28, 29].

1.3.3 Co-recettori di HIV

L'ingresso del virus dell'HIV-1 dipende da un complesso sistema di interazioni virus-ospite in cui sono coinvolte varie molecole sulla superficie cellulare [30-32].

L'attacco virale coinvolge l'interazione della glicoproteina gp120 virale con CD4, che agisce come principale recettore virale sulla cellula. gp120 legata a CD4 interagisce poi con vari membri della famiglia dei recettori chemochinici, che agiscono come co-recettori del virus [30].

In particolare tre recettori chemochinici sembrano svolgere un ruolo importante nell'infezione di diversi tipi di cellule umane:

- **CXCR4** (anche conosciuto come FUSINA o LESTR) è il recettore per il fattore di derivazione stromale (SDF-1 o CXCL12), ed è soprattutto usato come co-recettore dai ceppi di HIV-1 "linfocito-tropici", che generalmente si sviluppano negli stadi avanzati dell'infezione [32, 33]; in conformità a quest'interazione questi ceppi virali sono stati definiti X4-tropici.

- **CCR5** è il recettore delle β -chemochine CCL3, CCL4 e CCL5, ed è soprattutto usato dai ceppi di HIV "macrofago-tropici", che predominano nei primi stadi dell'infezione e possono infettare diversi tipi cellulari; in conformità a quest'interazione sono stati definiti R5-tropici.

- **CCR3** è il recettore dell'eotaxina o CCL11, ed è considerato un importante co-recettore virale nella microglia [34].

Oltre ai recettori chemochinici anche altre proteine presenti sulla membrana plasmatica sembrano influenzare la suscettibilità cellulare all'infezione, ad esempio l'espressione di CD26 o di CD44 sembra favorire l'infezione da parte di ceppi R5 [35-39]. Inoltre, durante la gemmazione virale dalle cellule infettate, molte molecole della superficie virale rimangono incorporate nell'involucro virale (che deriva dalla cellula ospite). Alcune di queste sono molecole d'adesione e contribuiscono all'attacco virale ad altre cellule interagendo con i rispettivi ligandi fisiologici espressi dalla cellula bersaglio [4, 30].

1.4 Epidemiologia, Diagnosi, Terapia

1.4.1 Epidemiologia

Al fine di descrivere l'andamento dell'epidemia da HIV/AIDS nel nostro Paese e di valutarne le attuali dimensioni è necessario presentare preliminarmente alcuni elementi di storia naturale dell'infezione da HIV.

Come noto, l'infezione da HIV può essere trasmessa tramite i rapporti sessuali, con l'esposizione a sangue, da madre a figlio durante la gravidanza o al momento del parto (più raramente con l'allattamento).

Stime della probabilità di trasmissione dell'infezione da HIV per un singolo rapporto sessuale sono disponibili da studi realizzati sia nei paesi industrializzati, sia nelle aree in via di sviluppo. Per quanto riguarda la trasmissione da donna a uomo, si passa da una stima massima di 13% in Kenya, al 3%-6% in Thailandia, al 0.1% in Europa. Uno studio condotto negli Stati Uniti su omosessuali maschi stimava invece una probabilità pari al 0.5%-3%. La variabilità delle stime può dipendere da una serie di fattori, alcuni dei quali sono in grado di aumentare (infezione recente o in stato avanzato, presenza di ulcere genitali, ectopia cervicale), altri di ridurre il rischio di trasmissione sessuale

dell'infezione da HIV (uso adeguato del profilattico, somministrazione di farmaci antiretrovirali).

Il rischio di trasmissione parenterale negli operatori sanitari si avvicina al 2%, mentre non è valutabile il rischio cui si espone un tossicodipendente, poiché in funzione della molteplicità dell'esposizione e delle modalità della stessa (scambio di siringhe).

I primi casi d'AIDS, furono diagnosticati in Italia nel 1982, a distanza di circa un anno dalla segnalazione di casi sporadici (diagnosticati in omosessuali) di Sarcoma di Kaposi e di polmonite da *Pneumocystis carinii* segnalati negli Stati Uniti. Alla fine del primo semestre del 1984 non si contavano più di 10 casi d'AIDS, nel secondo semestre dello stesso anno, fu diagnosticato il primo caso d'AIDS in un tossicodipendente.

Nel corso degli anni, l'AIDS è diventata la più importante causa di morte fra i giovani adulti di sesso maschile, ed una delle principali nelle giovani donne.

A partire dalla metà degli anni '80, nei maschi di età compresa fra i 25 ed i 29 anni, l'AIDS ha determinato un aumento inaspettato dell'andamento della mortalità generale, sino ad allora in costante diminuzione.

Nell'ultimo decennio la proporzione di pazienti di sesso femminile tra i casi adulti è andata progressivamente aumentando, passando dal 16.0% del 1985 al 24.9% del 1996.

L'incidenza dei casi di AIDS è andata aumentando nel corso degli anni sino a 1995, dopodiché è stata rilevata una tendenza alla diminuzione. Il tasso di letalità è complessivamente del 67.6%, ma tende al 100% per casi diagnosticati nella prima metà degli anni '80.

La definizione di caso di AIDS si è basata su criteri esclusivamente clinici sino a quando, nel 1985, si sono resi disponibili test sierologici per la diagnosi d'infezione da HIV. La definizione originale, messa a punto dal Center for Disease Control (CDC) di Atlanta nel 1981, è stata aggiornata nel corso degli anni (ultima revisione 1993). In

Tab.1 è riportata la classificazione CDC delle patologie indicatrici d'AIDS e del sistema di classificazione comprendente tre categorie cliniche (A, B e C), ciascuna suddivisa in tre gruppi secondo il numero di linfociti CD4⁺ presenti nel sangue periferico (500/ μ l, 499-200/ μ l e <200/ μ l).

Per concludere, il cambiamento dei comportamenti ha portato alla riduzione del numero delle sier conversionsi nei tossicodipendenti, mentre è aumentato il numero di casi tra i soggetti eterosessuali. L'infezione tende ora a diffondersi lentamente al di fuori dei classici gruppi ad elevata frequenza di comportamenti a rischio, configurandosi sempre di più come una classica malattia a trasmissione sessuale. L'impatto delle nuove terapie antiretrovirali sta inoltre modificando il corso della malattia da HIV, avendo come conseguenza un probabile allungamento del tempo d'incubazione e della sopravvivenza delle persone affette da AIDS.

Tabella 1: Classificazione CDC (revisione 1993)

1) Classificazione CDC delle malattie indicatrici di AIDS.

Categorie cliniche in soggetti con infezione da HIV documentata:

Categoria A*	Categoria C
Asintomatico: nessun sintomo al momento dell'infezione	Candidiasi di bronchi, trachea o polmoni
Infezione acuta: malattia tipo febbre ghiandola	Carcinoma cervicale (invasivo)
Persistente per settimane con esordio al momento dell'infezione	Coccidioomicosi disseminata extrapolmonare
Linfoadenopatia generalizzata persistente (PGL): linfoadenomegalia persistente per 3 mesi o più	Criptococchi extrapolmonare
in assenza di segni diretti di infezione	Criptosporidiosi cronica intestinale
	Malattia da citomegalovirus (fegato, milza, linfonodi)
	Retinite da citomegalovirus (con perdita della vista)
	Encefalopatia legata all'HIV
Categoria B**	
Angiomatosi bacillare	Herpes simplex: ulcere croniche o bronchiti, polmoniti, esofagiti
Candidiasi orofaringea	
Candidiasi vulvovaginale: persistente, frequente o resistente alla terapia	Istoplasmosi disseminata o extrapolmonare
Displasia cervicale (moderata o grave) / carcinoma cervicale <i>in situ</i>	Isopsoriasi cronica intestinale§
Sintomi costituzionali, tipo febbre o diarrea, persistente oltre 1 mese	Sarcoma di Kaposi
	Linfoma di Burkitt
Leucoplachia villosa, orale	Linfoma immunoblastico
Herpes zoster, almeno due episodi distanti o Coinvolgimento da più di un dermatomero	Infezioni da <i>Mycobacterium avium</i> o <i>M. Kansaii</i> , disseminate o extrapolmonari
Porpora idiopatica trombocitopenica	Polmoniti da <i>Pneumocystis carinii</i>
Listeriosi	Leucoencefalopatia multifocale progressiva
	Setticemia da Salmonella (ricorrente)

* Non si devono essere verificate le condizioni delle categorie B e C

** Non si devono essere verificate le condizioni della categoria C

§ Durata > di un mese

Categorie cliniche

N° linfociti T CD4⁺	A	B	C
(1) ≥ 500/μl	A1		
(2) 200-499/μl	A2	B2	C2
(3) 200/μl	A3	B2	C3

1.4.2 Diagnosi

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da HIV-1 si basa sia sulla determinazione degli anticorpi virus-specifici sia sull'evidenziazione degli acidi nucleici, e/o degli antigeni virali nonché sull'isolamento del virus. Dei due approcci, quello sierologico è sicuramente quello maggiormente impiegato, in quanto affidabile, rapido, economico, automatizzabile e utilizzabile per indagini su larga scala (es. donatori di sangue) e in grado di offrire livelli di sensibilità e specificità in costante miglioramento. D'altro canto, la ricerca del virus e/o delle componenti virali, risulta essenziale in determinate circostanze quali la diagnosi di trasmissione verticale dell'infezione o in fasi precoci di infezione quando gli anticorpi virus-specifici non sono ancora evidenziabili. Inoltre, la determinazione quantitativa dell'RNA virale si è rivelata un parametro virologico estremamente utile per il monitoraggio dell'infezione e del trattamento antivirale specifico.

Dal punto di vista sierologico, sono essenzialmente tre i gruppi di proteine HIV-1 specifiche in grado di indurre una risposta anticorpale utile ai fini diagnostici:

- proteine codificate dal gene *env*;
- proteine codificate dal gene *pol*; la trascrittasi inversa p51 e p66 e la endonucleasi/integrasi p23;
- proteine codificate dal gene *gag*: la proteine strutturali maggiori p24 e p18, la proteina strutturale interna p7 e il precursore p55.

La maggioranza dei soggetti produce anticorpi specifici entro un periodo di 6/8 settimane dall'infezione, un lasso di tempo noto come "finestra diagnostica" o "latenza sierologica". Gli anticorpi anti-HIV prodotti persistono per tutta la vita, specialmente quelli anti-*env* e quelli diretti contro il dominio immunodominante di gp41; un certo declino si osserva invece per gli anticorpi anti-*gag*. Il modello di risposta ai vari

antigeni virali appare sostanzialmente costante nei vari soggetti, mentre esiste una certa variabilità individuale nell'entità della risposta umorale specifica. In particolare, anticorpi anti-p24 e anti-proteine dell'involucro (gp41 ed il precursore gp160) sono quelli maggiormente evidenziabili nelle fasi precoci della sierconversione. Gli anticorpi anti-integrasi (p32) appaiono dopo di quelli diretti contro la trascrittasi inversa (p51 e p66) e come gli anticorpi anti-env, persistono per tutta la vita.

1.4.3 Indagini sierologiche

i. Saggi di screening

I saggi comunemente usati a scopo di screening sono saggi ELISA di tipo indiretto o a sandwich d'antigene, e meno frequentemente di tipo competitivo. Essendo l'ELISA un saggio di screening, non sorprende che sia stata privilegiata la sensibilità del sistema anche se ciò comporta una riduzione del livello di specificità. Questo in considerazione delle conseguenze potenzialmente gravi derivabili da un risultato falso negativo e dalla disponibilità di saggi di conferma cui è comunque necessario sottoporre ogni siero risultato ripetutamente positivo o equivoco in uno o più saggi ELISA. I campioni risultati non reattivi non richiedono ulteriori analisi. Il valore predittivo di un risultato ELISA varia considerevolmente in rapporto al tipo di popolazione testata. Infatti, la percentuale di risultati falsi positivi è sostanzialmente maggiore in una popolazione a basso rischio (es. donatori di sangue) e questo deve essere tenuto presente nell'interpretazione preliminare dei risultati.

Il test ELISA si basa sulla cattura d'anticorpi specifici anti-HIV da parte d'antigeni virali microtitolati e posti in pozzetti su piastra.

ii. Saggi di conferma

Il saggio di conferma più comunemente usato è un immunoblot (Western Blot). I lisati virali crudi di HIV, previa parziale purificazione, sono separati in base al peso molecolare mediante elettroforesi su gel e successivamente trasferiti su membrane di nitrocellulosa. La specificità del saggio è elevata sebbene i risultati siano generalmente espressi solo qualitativamente (presenza o assenza di reattività con una o più bande), è anche possibile una valutazione quantitativa (densitometrica) della reazione

A causa della possibilità della comparsa di falsi positivi, il Western blot non può essere utilizzato come saggio di screening. Infatti, il 20-30% di soggetti omosessuali o bisessuali, negativi per HIV-1 sia mediante ELISA sia con PCR, dimostra reattività (indeterminata) per una o più bande. Esso può essere quindi utilizzato come saggio di conferma, per la determinazione della specificità dei risultati positivi nei saggi ELISA. Inoltre, uno studio longitudinale su un gruppo di soggetti omosessuali con un risultato iniziale indeterminato in Western Blot ha dimostrato che tale reattività persisteva inalterata per più di un anno. Risultati analoghi sono stati ottenuti in gruppi di popolazione a basso rischio. L'alta frequenza di risultati indeterminati, la stragrande maggioranza dei quali dovuta a reattività non specifiche, rende il Western Blot un test non idoneo per indagini su larga scala, mentre mantiene la sua elevata utilità come test di conferma di un risultato positivo o equivoco in ELISA o altro test di screening.

iii. Indagini virologiche

a) Isolamento virale

La tecnica dell'isolamento virale è considerata la metodica di riferimento di tutte le procedure diagnostiche, ed è la più utile per ottenere una diagnosi di certezza d'infezione da HIV. L'isolamento, abbinato ad altre metodiche dirette (PCR), è

indispensabile per effettuare una diagnosi precoce d'infezione congenita in neonati da madri sieropositive per HIV-1. Infatti, la persistenza nel sangue del neonato di anticorpi materni impedisce l'utilizzo di metodiche sierologiche. Negli adulti la sua applicazione è limitata a quei soggetti che presentano una sierologia indeterminata per HIV-1. La sua esecuzione comporta l'impiego di colture linfocitarie primarie e continue, personale altamente qualificato, laboratori particolarmente attrezzati (classe P3) e richiede tempi d'esecuzione relativamente lunghi. Queste limitazioni non ne hanno permesso la diffusione né l'applicazione come test diagnostico di routine. La diffusione del virus è pressoché ubiquitaria nel soggetto infetto, pertanto l'isolamento può essere effettuato da diversi tessuti e fluidi corporei.

b) Determinazione della proteina p24 di HIV-1

Le proteine p24 e p17, derivanti dal precursore p55 e codificate dal gene *gag*, costituiscono il "core" di HIV-1. La proteina p24 può essere presente nel plasma in forma libera o legata ad anticorpi specifici. Durante le prime settimane successive all'infezione non sono riscontrabili anticorpi anti-HIV, per cui è possibile identificare l'antigene p24 nel siero di soggetti infetti. Con la comparsa degli anticorpi virus specifici, e nella fase asintomatica, è difficile individuare la proteina p24 libera, in seguito alla formazione di immunocomplessi con i relativi anticorpi anti-p24. Negli stadi terminali della malattia si osserva un aumento dell'antigene p24 libero nel plasma del paziente, ed una progressiva diminuzione, fino alla scomparsa degli anticorpi anti-p24. Il saggio della p24 libera può essere di aiuto diagnostico nel caso di una sospetta infezione recente e nella diagnosi di infezione nei neonati da madre sieropositiva. E' necessario in ogni caso ricordare che questa proteina non è un marcatore virale presente in tutti i pazienti.

Il test ELISA di cattura per la determinazione della proteina p24 viene effettuato utilizzando anticorpi monoclonali specifici per la proteina p24, fissati ad un supporto solido, ed incubati con il siero (con altri fluidi corporei) del paziente, o in alternativa con il surnatante di colture delle cellule del paziente. L'antigene p24 di HIV-1 non complessato reagirà con il corrispondente anticorpo. Nella fase successiva verrà aggiunto un antisiero anti-p24 marcato con un enzima. L'avvenuta reazione verrà a questo punto evidenziata con un substrato idoneo. L'utilità di questo saggio è però limitata dal fatto che la p24 può essere complessata con anticorpi specifici, in particolare nella fase asintomatica della malattia. Per ovviare a questo, si prevede un trattamento a pH acido del siero che permette di dissociare gli immunocomplessi, aumentando perciò la sensibilità del saggio in soggetti HIV-positivi sia sintomatici che asintomatici.

c) PCR

La tecnica d'amplificazione genica mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) per la ricerca del DNA provirale di HIV è oggi utile essenzialmente nelle seguenti tre situazioni: 1) diagnosi di trasmissione verticale dell'infezione da HIV-1; 2) tipizzazione delle varianti genomiche dei ceppi di HIV quando richiesto per motivi medico-legali; 3) monitoraggio della terapia antivirale specifica e dell'insorgenza di ceppi resistenti.

La rilevazione dell'amplificato può essere eseguita tramite rilevazione enzimatica (primer o sonda biotinilata), ed anche in questo caso, il saggio deve essere eseguito in più repliche e il numero di cellule infette determinato deve essere riferito a 10^6 cellule. Bisogna tuttavia sottolineare che questa metodica non esiste sotto forma di kit commerciale, ed è pertanto utilizzata soltanto in laboratori specializzati che siano in grado di eseguire saggi di biologia molecolare in condizioni controllate. Dal momento

che la determinazione del numero di cellule infette tramite PCR quantitativa è in grado di rilevare tutte le cellule portatrici di cDNA (quelle latentemente infette, quelle cronicamente infette e quelle che replicano virus attivamente), essa non fornisce alcuna informazione sulla replicazione attiva del virus, ma è l'unica che entro certi limiti, consente di valutare l'estensione dell'infezione latente e può rappresentare un buon marcatore di progressione dell'infezione.

1.4.4 Terapia

I farmaci antivirali per essere utilizzabili devono essere selettivi, vale a dire capaci di inibire la replicazione virale senza interferire con le funzioni dell'ospite,

A differenza dei farmaci antibatterici, che mirano a strutture o vie biosintetiche che non esistono nell'ospite, nei farmaci antivirali la selettività è relativa: i virus, infatti, utilizzano i meccanismi biosintetici ed energetici dell'ospite, quindi il farmaco in genere presenta un'affinità anche per le strutture cellulari analoghe a quelle virali. Ne consegue che i farmaci antivirali sono provvisti di un certo grado di tossicità. D'altro canto, una maggiore selettività presuppone un restringimento del bersaglio virale e quindi una maggiore probabilità di salvezza per un mutante divenuto resistente al farmaco. Tossicità e farmacoresistenza costituiscono quindi i principali problemi della terapia antivirale, specialmente se protratta. Attualmente i farmaci anti-retrovirali approvati per il trattamento dell'infezione da HIV sono sedici, molti altri sono attualmente in sviluppo (**Tab. 2**).

Il ciclo vitale di HIV si avvale di una successione di diversi stadi, e per ogni stadio si sono identificati farmaci in grado di ostacolare l'azione virale:

- **Adsorbimento e penetrazione:** nelle infezioni virali, gli agenti capaci di inibire l'assorbimento possono svolgere un'azione efficace nella prevenzione delle infezioni,

ma hanno una scarsa efficacia nel controllo di quelle già stabilite. L'entrata del virus nella cellula consta in realtà di tre fasi successive costituite da 1) legame di gp120 a CD4, 2) legame di gp120 ai recettori chemochinici, 3) fusione della membrana del virus con quella della cellula ospite. I farmaci attualmente disponibili mirano ad inibire ognuno di questi passaggi. Per tale motivo possono essere distinti in inibitori del legame a CD4, inibitori dei recettori chemochinici (CCR5 e CXCR4) ed inibitori della fusione.

- **Inibitori del legame a CD4:** questi farmaci mirano ad impedire il legame di gp120 a CD4, per esempio il PRO 542 è una proteina di fusione anticorpo simile CD4/IgG2 in grado di essere legata da gp120 di HIV e si è dimostrata avere attività anti-retrovirale in vitro contro isolati primari [40] e in vivo su modelli animali [41].

- **Inibitori dei recettori chemochinici:** una nuova prospettiva di strategia terapeutica si basa sull'evidenza che le chemochine, in vitro, legandosi al proprio recettore ed impedendone l'interazione con l'HIV, possono inibirne la replicazione.

- **Inibitori della fusione:** questa è una nuova generazione di farmaci che punta a inibire la fusione virus/cellula; attualmente l'unico inibitore della fusione approvato è l'enfuvirtide (T-20), un altro, il T-1249 è in corso di sperimentazione clinica.

- **Trascrizione:** la trascrizione dell'RNA genomico nel DNA bicatenario provirale ad opera della trascrittasi inversa (TI) è una fase replicativa assolutamente specifica per i retrovirus ed è quindi logico che su di essa siano diretti vari inibitori, assimilabili a due diverse categorie: 1) *gli inibitori analoghi nucleosidici della TI (NRTIs)* che, fosforilati dalla cellula, vengono inseriti dalla TI nel DNA nascente determinandone l'arresto della sintesi (terminatori di catena); 2) *gli inibitori non analoghi nucleosidici (NNRTIs)* della TI che, formando complessi con l'enzima, ne inibiscono la funzione. A differenza dei primi, che agiscono su tutti i retrovirus, questi inibiscono solo l'HIV.

Farmaci anti-retrovirali attualmente approvati	Farmaci anti-retrovirali in sviluppo
<p>Inibitori della TI di HIV</p> <p><i>Analoghi nucleosidici</i> zidovudina (ZDV, AZT) didanosina (ddI) zalcitabina (ddC) stavudina (d4T) lamivudina (3TC) abacavir (ABC)</p> <p><i>Non analoghi nucleosidici</i> neviraparina (NVP) delavirdina (DLV) efavirenz (EFV)</p> <p><i>Analoghi nucleotidici</i> tecnofovir (TDF)</p>	<p>Inibitori delle proteasi di HIV</p> <p>atazanavir (ATV, BMS-232 632) triptanavir (TPV, PNU-140690) mozenavir (DMP-450) TMC 114</p> <p>Inibitori dell' adsorbimento e della penetrazione</p> <p><i>Inibitori del legame a CD4</i> PRO 542 BMS-806</p> <p><i>Inibitori dei recettori chemochinici – CXCR4</i> AMD-3100</p> <p><i>Inibitori dei recettori chemochinici – CCR5</i> Schering C (SCH-C, SCH 351125) PRO 140 Schering D (SCH-D) UK 427,857</p> <p><i>Inibitori della fusione</i> T-1249</p>
<p>Inibitori delle proteasi di HIV</p> <p>saquinavir (SQV) ritonavir (RTV) indinavir (IDV) nelfinavir (NFV) amprenavir (APV) lopinavir/ritonavir (LPV/r)</p>	<p>Inibitori dell'integrasi</p> <p>S-1360</p>
<p>Inibitori dell'adsorbimento e della penetrazione</p> <p><i>Inibitori della fusione</i> enfuvirtide (T-20)</p>	

Tabella 2: Farmaci anti-retrovirali approvati e in corso di sviluppo.

Caratteristica comune di tutti gli inibitori nucleosidici della TI è un buon indice terapeutico, poiché hanno un'affinità per l'enzima virale molto superiore rispetto a quella per la DNA polimerasi cellulare. Una caratteristica negativa di questi farmaci è quella di selezionare con relativa facilità, se impiegati singolarmente, mutanti resistenti che possono rendere inefficace la terapia entro pochi mesi di somministrazione.

Con l'integrazione del DNA provirale nel genoma della cellula ospite, gli inibitori della TI non esercitano più alcun'azione inibente. Tuttavia, l'integrazione nel genoma della cellula ospite, mediata dall'integrasi virale, potrebbe costituire un potenziale bersaglio farmacologico, ma i tentativi finora effettuati non hanno avuto successo. Inoltre, sono risultati inefficaci i tentativi di blocco dell'azione della proteina virale di regolazione tat, che funge da attivatore della trascrizione.

- **Traduzione e modificazioni post-traduttive:** la traduzione degli mRNA virali avviene interamente con gli apparati cellulari, pertanto non sono attaccabili da farmaci selettivi. Sono invece operate dal virus le modificazioni post-traduttive. La proteasi virale è un enzima dimerico della famiglia delle proteasi aspartiche codificate dal gene *pol*, di cui si è identificata la struttura tridimensionale; questo ha permesso di sintetizzare varie molecole, a basso peso molecolare, capaci di formare complessi con l'enzima inibendone l'attività.

- **Assemblaggio, liberazione e maturazione dei virioni:** sono attivi gli inibitori delle proteasi che, se incorporati nei virioni in gemmazione, impediscono la scissione proteolitica dei precursori proteici p55 e p160, rispettivamente nella proteina capsidica p24 e nella proteina di matrice p17 e negli enzimi TI, integrasi e proteasi.

Da alcuni anni si utilizzano contemporaneamente sostanze con diversi meccanismi d'azione, realizzando così un'associazione sinergica; lo spettro farmacologico è così

parecchio aumentato. Con la terapia combinata si può ottenere una maggiore efficacia antivirale ed una riduzione del rischio di selezionare mutanti resistenti.

Rimane in ogni caso determinante la tempestività della diagnosi e del trattamento.

2. SCOPO DEL LAVORO

In questa tesi ci siamo proposti di analizzare il ruolo svolto nell'infezione da HIV da parte di alcune molecole di membrana dei linfociti T, partendo dall'osservazione che, nei linfociti T helper, il legame di gp120 a CD4 induce l'associazione laterale di varie molecole al CD4 stesso e che gp120 derivate da ceppi virali diversi inducono spettri di associazioni in parte differenti [42, 43]. Era stato pertanto proposto che lo spettro di associazioni indotto dalla gp120 potrebbe avere un ruolo nelle differenze clinico-biologiche mostrate dai diversi ceppi virali.

In questo lavoro ci si è concentrati su tre molecole indotte ad associare a CD4 da gp120, scelte sulla base di varie osservazioni che le mettevano in relazione con diversi aspetti dell'infezione da HIV (vedere le sezioni di "Introduzione" specifiche per ciascuna molecola): il recettore costimolatorio H4/ICOS, il recettore di morte CD95/Fas e la molecola multifunzionale CD38.

Il lavoro svolto ha permesso di ottenere i seguenti risultati principali:

- Si è osservato che **H4/ICOS** è un ottimo marcatore dell'evoluzione di H4/ICOS in quanto i suoi livelli di espressione correlano in modo stretto con la viremia. In vitro, gp120 induce l'espressione di H4/ICOS e la stimolazione di quest'ultimo protegge i linfociti dall'apoptosi indotta da gp120. Altri autori hanno poi dimostrato che la stimolazione di H4/ICOS inibisce l'infezione virale agendo a livello della fase d'ingresso del virus.
- Si è osservato che difetti ereditari della funzione di **CD95 (Fas)** sono associati a un'evoluzione rallentata dell'immunodeficienza in soggetti infettati da HIV. Infatti questi difetti sono particolarmente frequenti nei soggetti HIV⁺ definiti "non progressors".

- Si è osservato che l'espressione di **CD38** inibisce l'infezione cellulare da parte di HIV agendo a livello della fase d'ingresso del virus. Questa azione inibitoria non dipende dal "signaling" della molecola ed è mimata da un peptide sintetico solubile corrispondente agli aminoacidi 51-74 della porzione extracellulare membrano-prossimale di CD38.

3. RUOLO DELLA MOLECOLA COSTIMOLATORIA H4/ICOS NELL'EVOLUZIONE DELL'INFEZIONE DA HIV-1

3.1 Introduzione

3.1.1 L'attivazione dei linfociti T

L'attivazione dei linfociti T è regolata da segnali che si avvalgono del complesso T Cell Receptor (TCR)/CD3 e da varie molecole costimolatorie che interagiscono con i loro ligandi espressi dalle Cellule Presentanti l'Antigene (APC). In assenza di segnali costimolatori la cellula diventa anergica o muore per apoptosi.

La molecola costimolatoria meglio conosciuta è **CD28**, che è espresso in modo costitutivo; i suoi ligandi sono B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) espressi dalle cellule APC. Esso amplifica i segnali innescati dal complesso TCR ed induce proliferazione, secrezione di citochine ed inibisce l'induzione di anergia e l'apoptosi.

Altri membri della famiglia sono:

- **CTLA-4** (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4), classificato come membro della famiglia di CD28 sulla base di una elevata omologia di sequenza con CD28 e della capacità di legare anch'esso B7-1 e B7-2, ma con maggiore affinità rispetto a CD28. A differenza di CD28, molecola costimolatoria espressa anche dai linfociti T quiescenti, CTLA-4 è espresso solo dai linfociti T attivati e trasmette un segnale inibitorio.
- **PD-1** (Programmed Death Gene-1), come CTLA-4, inibisce la proliferazione mediata dall'attivazione del TCR nei linfociti T e la produzione di citochine; non ha omologia di sequenza con CD28, ma lega due ligandi appartenenti alla famiglia di B7, PD-L1 (B7-H1) e PD-L2 (B7-DC).

- **ICOS/H4** (Inducible Costimulator), come CTLA-4, ha una significativa omologia di sequenza con CD28 ed è espresso solo da linfociti T attivati. Lega B7h (B7RP1 o GL50), un membro della famiglia di B7 espresso sia nelle cellule della linea ematopoietica sia in quelle della linea non-ematopoietica. Come CD28 trasmette segnali costimolatori che potenziano la proliferazione cellulare e la secrezione citochinica indotta dalla stimolazione del TCR. La stimolazione di CD28 porta alla produzione di IL-2, mentre ICOS costimola la proliferazione di linfociti T e la secrezione di diverse citochine, quali IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, GM-CSF, ma non IL-2.

La molecola H4 è stata descritta per la prima volta dal nostro laboratorio nel 1996 nel topo e nel 1999 nell'uomo, utilizzando un anticorpo monoclonale prodotto da criceti armeni immunizzati con un clone linfocitario T di topo. L'anticorpo era stato selezionato sulla base della sua capacità di costimolare l'attivazione di linfociti T di topo innescata da anticorpi anti-TCR. Successivamente Kroczeck e coll. hanno clonato nell'uomo una nuova molecola costimolatoria, denominata ICOS (Inducible T-cell Co-stimulator), espressa selettivamente da linfociti T attivati [59], che è successivamente risultata corrispondere a H4 [60].

I membri della famiglia di B7 sono espressi sui monociti, sulle cellule dendritiche, sui linfociti B e talvolta sui linfociti T, sulle cellule epiteliali ed endoteliali [44, 45]. Sebbene B7-1/B7-2 siano principalmente espressi dagli organi linfoidei, B7h, PD-L1 e PD-L2 sono espressi anche in organi non linfoidei, quali polmone, cuore e rene [45-48]. Dal punto di vista funzionale, ICOS è più potente di CD28 nel regolare la produzione di citochine nelle cellule già attivate, ma non nei linfociti T naive quiescenti, la cui attivazione sembra dipendere prevalentemente dalla costimolazione mediata da CD28.

Sembra inoltre che ICOS sostenga preferenzialmente lo sviluppo dei linfociti Th2. Infatti i cloni linfocitari Th2 esprimono ICOS a livelli più alti rispetto ai linfociti Th1 [49-51], ed il blocco o l'assenza dell'interazione tra ICOS e B7h favorisce il differenziamento dei linfociti Th1 "in vitro" [52-57]. Tuttavia, esistono prove a supporto del fatto che la costimolazione indotta da ICOS possa contribuire anche allo sviluppo di alcune risposte Th1.

La funzione di ICOS nelle cellule CD8⁺ è ancora poco conosciuta, ma è stato recentemente suggerito che esso svolga un ruolo nella risposta anti-tumorale e nella risposta ai patogeni intracitoplasmatici. È stato inoltre suggerito che ICOS possa essere coinvolto nel differenziamento dei linfociti T regolatori (Treg), che producono elevati livelli di IL-10 [58].

3.1.2 Ruolo di H4/ICOS nell'infezione da HIV

L'infezione primaria da HIV produce una sindrome simil-influenzale caratterizzata da alta viremia e dal crollo del numero dei linfociti CD4⁺ circolanti. Successivamente un'efficace risposta immune porta ad una netta riduzione della viremia e ad un incremento, fino anche alla normalizzazione, del numero di linfociti CD4⁺, ma essa non riesce a eradicare l'infezione, che entra in un prolungato stadio asintomatico. In questa fase il virus persiste nei tessuti linfoidi ed il numero di linfociti CD4⁺ cala gradualmente. Quando il numero di linfociti CD4⁺ scende sotto ai 500/μL la risposta immunitaria collassa, la viremia progressivamente aumenta e il paziente entra nello stadio di AIDS conclamato caratterizzato dallo sviluppo di infezioni opportunistiche e/o di particolari tumori [61, 62].

La conta delle cellule CD4⁺ nel sangue periferico è utilizzata routinariamente nella valutazione dell'evoluzione dell'infezione, tuttavia essa non predice la durata dello

stadio asintomatico. Nel tentativo di individuare nuovi parametri utili nella prognosi della malattia, vari autori hanno valutato il significato prognostico di vari marcatori di immunoreattività, quali l'espressione di alcuni marcatori di superficie dei linfociti attivati ed i livelli serici di varie citochine [61-66]. Il marker prognostico più accurato è sembrato essere l'espressione superficiale della molecola di attivazione CD38. Infatti nell'infezione acuta l'espansione periferica dei linfociti CD8⁺CD38⁺ precede la risoluzione dei sintomi e la caduta della viremia, mentre nello stadio asintomatico i livelli di espressione del CD38 nei linfociti CD8⁺ rappresentano un buon indicatore predittivo del declino delle cellule CD4⁺ e dello sviluppo dell'AIDS [68-70].

3.2 Scopo del lavoro

In questo lavoro ci siamo quindi proposto di valutare l'espressione di H4/ICOS durante il corso dell'infezione da HIV-1 e la sua utilità come marcatore della progressione dell'infezione stessa, in rapporto ad altri marcatori quali CD38, CD25 e HLA-DR.

3.3 *Materiali e Metodi*

3.3.1 *Pazienti HIV⁺*

L'analisi è stata condotta sul sangue periferico ottenuto da 55 pazienti HIV⁺. La sieropositività è stata definita dalla presenza di anticorpi anti-HIV rilevati tramite test ELISA (E.I. DuPont, Wilmington, DE) e comprovata con successiva analisi in Western Blot (E.I. DuPont, Wilmington, DE). I pazienti sono stati suddivisi in classi distinte in base ai dati clinici ottenuti all'inizio dello studio ed ai criteri classificativi del Centre for Disease Control (CDC) di Atlanta: 14 pazienti presentavano infezione primaria da HIV (IP), 20 erano asintomatici (ASN) e 21 presentavano AIDS conclamato. I controlli per lo studio erano rappresentati da 25 donatori sani. L'età media dei donatori era 31 ± 9 anni (range: 23-45 anni), mentre quella dei malati era 40 ± 9 anni (range: 26-61 anni). I pazienti IP sono stati studiati dopo trattamento con HAART costituito dall'associazione di un inibitore delle proteasi, più due inibitori della trascrittasi inversa. Tre pazienti con AIDS seguiti nel follow-up erano andati incontro al fallimento della terapia (iniziale risposta con livelli di HIV-RNA minori di 500 copie/ml seguiti da in progressivo incremento dei livelli di HIV-RNA maggiori di 500 copie/ml). La carica virale è stata valutata tramite kit Chiron ED i risultati sono espressi come numero di copie di RNA/ml di plasma.

I pazienti coinvolti nello studio sono stati seguiti presso il Dipartimento di Malattie Infettive ed il Dipartimento di Ematologia dell'Università Cattolica di Roma.

3.3.2 *Anticorpi monoclonali ed analisi in immunofluorescenza*

Per le analisi in immunofluorescenza sono stati usati i seguenti anticorpi: anticorpi monoclonali per antigeni umani anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD25, -CD38, -CD14, -CD16, -CD19, -CD45, -HLA-DR (Becton-Dickinson) coniugati con PE o con FITC (Becton-Dickinson). Gli mAb in grado di riconoscere CD69, CD2 e Ly-6C sono stati acquistati dalla Pharmingen (San Diego, CA)

L'anticorpo C398.4A (H4), utilizzato in esperimenti sul modello murino o sul quello umano, sono stati prodotti nel nostro laboratorio e purificati per cromatografia di affinità su proteina G dal supernatante della coltura del corrispondente ibridoma.

La produzione dell'anticorpo anti-H4 C398.4A (IgG di criceto) e' stata condotta come riportato nella referenza [73]. L'mAb era rivelato con un siero di capra anti-Ig di criceto coniugato con FITC, pre-adsorbito con Ig di topo e di ratto (Caltag, Burlingame, CA, USA). L'analisi delle cellule attivate con PHA era effettuata usando anticorpi anti-CD25, -HLA-DR (Becton Dickinson), -CD137 (Ansell, Bayport, MN) e anti-CD38 (OKT10) (ATCC, Rockville, MD) individuati con un siero di capra anti-Ig di topo coniugato con FITC (Becton Dickinson). Nelle colorazioni a tre colori H4 era colorato con l'anticorpo C398.4A coniugato con biotina più Quantum-Red Avidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA). I campioni sono stati analizzati con citofluorimetro FACScan (Becton Dickinson) utilizzando una finestra FSC/SSC per i linfociti. La densità antigenica e' stata espressa come rapporto della intensità media di fluorescenza (MFI-R) calcolato con la formula:

$$\text{MFI-R} = \frac{\text{MFI dell'istogramma del campione (unità arbitrarie)}}{\text{MFI dell'istogramma del controllo (unità arbitrarie)}}$$

3.3.3 Analisi delle associazioni intermolecolari laterali: metodica del cocapping ed analisi mediante FRET

I linfociti CD4⁺ sono stati coltivati per due giorni in RPMI+10%FBS+1µg/ml PHA, lavati e coltivati per ulteriori tre giorni in RPMI+10%FBS+10 U/ml di IL-2 ricombinante, quindi usati nei saggi di cocapping. Sono stati utilizzati due set di anticorpi: uno era coniugato con arsonato (Ars) e colorato con siero di coniglio anti-Ars coniugato con FITC purificato per affinità, gli altri erano coniugati con biotina e colorati con avidina coniugata con rodamina (TRITC) (Vector, Burlingame, CA). Per l'analisi sono stati utilizzati i seguenti anticorpi purificati mediante cromatografia d'affinità su proteina G: OKT3 (CD3), OKT4 (CD4), OKT9 (CD71) (ATCC); Moon1(CD31).

Le cellule sono state quindi lavate, risospese in RPMI+10%FBS e trattate con concentrazioni saturanti (2µg/ml) di gp120_{IIIb} ricombinante (Intracell, London, UK), rgp120_{MN} (Agmed, Bedford, MA) o gp120₄₅₁ purificata per affinità (ABI, Columbia, MD) o con lo stesso volume di PBS (Phosphate Buffer Salinum) a 4°C per 30 min. Concentrazioni saturanti dell'anticorpo monoclonale OKT4 sono state aggiunte alla sospensione cellulare ed abbiamo proseguito l'incubazione a 4°C per ulteriori 30 min. Le cellule sono state quindi lavate con PBS freddo e colorate a 4°C per 30 min con un siero anti-Ars coniugato con FITC. Il capping è stato indotto per 15 min a 37°C usando l'mAb appropriato coniugato con Ars più siero anti-Ars coniugato con FITC. Le cellule sono state quindi lavate con PBS freddo + 5% FBS + 0.1% NaN₃, colorate a 4°C con anticorpi (C3984A, OKT3, OKT9, Moon-1) coniugati con biotina e avidina coniugata con TRITC, fissate con paraformaldeide ed analizzate con un microscopio a fluorescenza. Le cellule che presentavano una colorazione con FITC limitata ad un

terzo della membrana erano considerate positive al capping. Il cocapping e' definito come colocalizzazione della colorazione con TRITC nell'area di formazione del "cap".

3.3.4 Saggio di morte cellulare

I linfociti CD4⁺ (10⁵ cellule/pozzetto) coltivati per 6 giorni con PHA+IL-2 sono stati incubati con solo terreno (controllo) o con anticorpi anti-Fas (isotipo IgM) (1µg/mL) (UBI, Lake Placid, NY), o con gp120_{MN} ricombinante (2µg/mL) (Agmed, Bedford, MA) o con gp120₄₅₁ purificata per affinità (2µg/mL) (ABI, Columbia, ML) in piastre a 96 pozzetti in un volume finale di 100µL di RPMI+10%FBS. Dopo 24 ore veniva effettuata la conta delle cellule sopravvissute in ogni pozzetto con test di esclusione al blu tripano [5, 74]. I risultati sono stati espressi come "perdita di cellule specifica %" calcolata come segue:

$$\left\{ 100 - \left[\frac{\text{totale delle cellule vive nel pozzetto del test}}{\text{totale delle cellule vive nel pozzetto del controllo}} \right] \right\} \times 100$$

3.4 RISULTATI

3.4.1 Espressione della molecola H4/ICOS durante l'infezione da HIV-1

Per valutare la possibile utilità della valutazione dell'espressione di H4/ICOS nel corso dell'infezione da HIV, abbiamo condotto un'analisi che ha coinvolto 55 pazienti infetti da HIV: 14 con infezione primaria (pazienti IP), 20 asintomatici (pazienti ASN), e 21 con AIDS conclamato. I dati ottenuti mostravano che la proporzione di cellule CD4⁺H4/ICOS⁺ era più elevata nei pazienti IP e AIDS che nei donatori sani (controlli), e nei pazienti con AIDS rispetto a quelli con ASN (**Tab. 3** e **Fig. 7**). I linfociti CD8⁺ avevano un andamento simile, ma le differenze erano significative solo tra i soggetti PI ed i soggetti di controllo (**Tab. 3**). Le variazioni osservate nell'espressione di H4/ICOS rispecchiavano variazioni reali nel numero di cellule H4/ICOS⁺ in quanto anche il numero assoluto di cellule CD4⁺H4/ICOS⁺ e CD8⁺H4/ICOS⁺ (cellule/ μ l) era significativamente più alto negli IP che negli ASN e nei controlli (**Tab. 3**). Questo spettro di espressione suggerisce che H4/ICOS sia espresso durante corso della infezione da HIV con una netta cinetica bifasica, la quale è molto più evidente rispetto a quella accennata dagli altri marcatori di attivazione presi in esame in questi stessi pazienti, ovvero CD38, CD25 e HLA-DR (**Tab. 3**).

L'analisi di questi dati evidenzia tuttavia una notevole variabilità nell'espressione di H4/ICOS nei pazienti con IP. Per valutare se questa fosse legata all'intervallo intercorso tra la sierconversione e la nostra analisi, abbiamo diviso il gruppo IP in due sottogruppi: uno comprendente i pazienti valutati meno di tre mesi dopo la sierconversione (IP-precoci, n=6), l'altro comprendente i pazienti valutati dopo 4-12 mesi dalla sierconversione (IP-tardivi, n=8). Quest'analisi ha dimostrato che gli IP-precoci presentavano proporzioni di cellule H4/ICOS⁺ significativamente più elevate rispetto agli IP-tardivi tanto a livello delle cellule CD4⁺ che di quelle CD8⁺

Gruppo di Pazienti	PBMC ^a CD4 ⁺				PBMC CD8 ⁺			
	H4/ICOS	CD25	CD38	HLA-DR	H4/ICOS	CD25	CD38	HLA-DR
CTR (n=25)	3 (2-5)	39 (26-35)	43 (35-59)	8 (6-10)	4 (2-4)	5 (4-7)	39 (30-48)	17 (14-24)
PI (n=14)	12 ^b (5-46)	12 ^{b,c} (8-23)	62 ^c (61-65)	17 ^{b,c} (12-31)	12 ^b (2-31)	0 ^{b-d} (0-1)	57 ^{b,c} (51-61)	37 ^{b,c} (29-44)
AD (n=20)	6 ^c (2-10)	23 (21-30)	66 ^c (63-73)	21 ^{b,c} (15-26)	3 (1-4)	3 ^{b,c} (1-4)	73 ^{b,c} (61-79)	50 ^{b,c} (38-61)
AIDS (n=21)	13 ^b (10-19)	33 (21-39)	82 ^b (74-90)	52 ^b (29-83)	3 (1-10)	5 ^d (3-8)	91 ^b (84-94)	60 ^b (52-71)

Tab.3 Espressione percentuale di H4/ICOS in PBMC CD4⁺ e CD8⁺ nei gruppi di pazienti HIV⁺ e nel gruppo di soggetti di controllo. **(a)**: I PBMC sono stati colorati con anticorpi anti-CD4 e -CD8 PE e con anticorpi anti-CD25, -CD38 o HLA-DR marcati con FITC. H4/ICOS e' stato rivelato con un anticorpo anti-H4 e con un siero anti-Ig di criceto FITC. I risultati sono espressi come percentuale di CD4⁺ e CD8⁺ che co-esprimono H4/ICOS. L'analisi statistica e' stata effettuata con il test di Mann-whitney. **(b)**: dati significativamente differenti rispetto al controllo (CTR); **(c)**: dati significativamente differenti rispetto ai pazienti asintomatici (AD); **(d)**: dati significativamente differenti rispetto ai pazienti AIDS.

ASN

PI

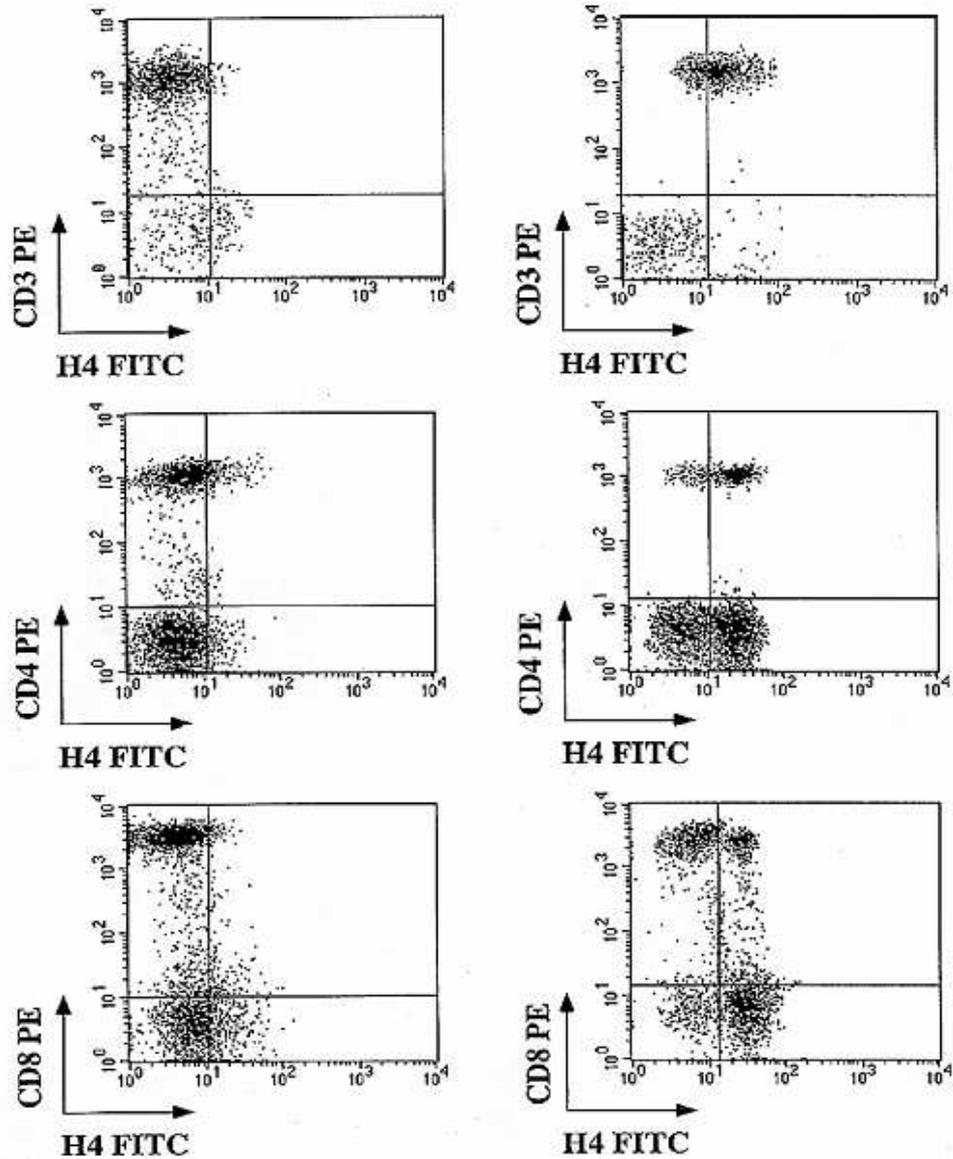


Fig. 7 Analisi citofluorimetrica dell'espressione di H4 umano su linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ isolati da un soggetto HIV⁺ in fase asintomatica (ASN) ed uno in fase di infezione acuta (PI). Le cellule PBM sono state purificate mediante centrifugazione su gradiente di densità, quindi colorate con anticorpi monoclonali anti-CD4 o anti-CD8 coniugati con (PE) e con mAb anti-H4 (C398.4A) rivelato successivamente con Ig di capra anti-criceto coniugate con FITC.

(CD4⁺H4/ICOS⁺: IP-precoci 40±16% vs IP-tardivi 10±3%, p<0.01, CD8⁺H4/ICOS⁺: IP-precoci 27±18% vs IP-tardivi 9±4%, p<0.05 rispettivamente). Inoltre gli IP-tardivi presentavano anche più elevate proporzioni di cellule CD8⁺HLA-DR⁺ (IP-precoci 52±8% vs IP-tardivi 28±6%,p<0.05). Al contrario non si osservava nessuna differenza significativa nell'espressione di CD25 e CD38.

Questi dati suggerivano che H4/ICOS fosse preferenzialmente espresso nelle primissime fasi dell'infezione. Per confermare questa possibilità abbiamo seguito l'espressione della molecola per 11 mesi in tre pazienti IP-precoci (**Fig. 8**). La prima analisi, effettuata al momento della diagnosi in presenza di una viremia molto elevata, ha evidenziato elevati livelli di espressione di H4/ICOS sia sui linfociti CD4⁺ sia su quelli CD8⁺. Successivamente i pazienti sono stati sottoposti a trattamento con terapia HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy), la quale induceva un drammatico crollo sia della viremia sia l'espressione di H4/ICOS. Successivamente entrambi i parametri rimanevano bassi per tutta la restante durata del follow-up (48 settimane) che accompagnava il paziente nella fase asintomatica di malattia. Abbiamo anche seguito per varie settimane l'espressione di H4/ICOS in tre pazienti con AIDS conclamato in cui la terapia HAART non aveva avuto esito positivo: questi pazienti mostravano un'iniziale risposta alla terapia (con livelli di HIV-RNA minori di 500 copie/mL), seguita da un progressivo incremento dei livelli di HIV-RNA. Quest'analisi ha dimostrato che il fallimento della HAART si accompagnava a un rapido aumento dell'espressione di H4/ICOS sia nelle cellule CD4⁺ sia in quelle CD8⁺. Questa cinetica di espressione era caratteristica di H4/ICOS in quanto gli altri marcatori di attivazione esaminati (CD25, CD38, e HLA-DR) presentavano un "trend" simile, ma con movimenti più contenuti e meno strettamente legati ai movimenti della viremia (**Fig. 9**).

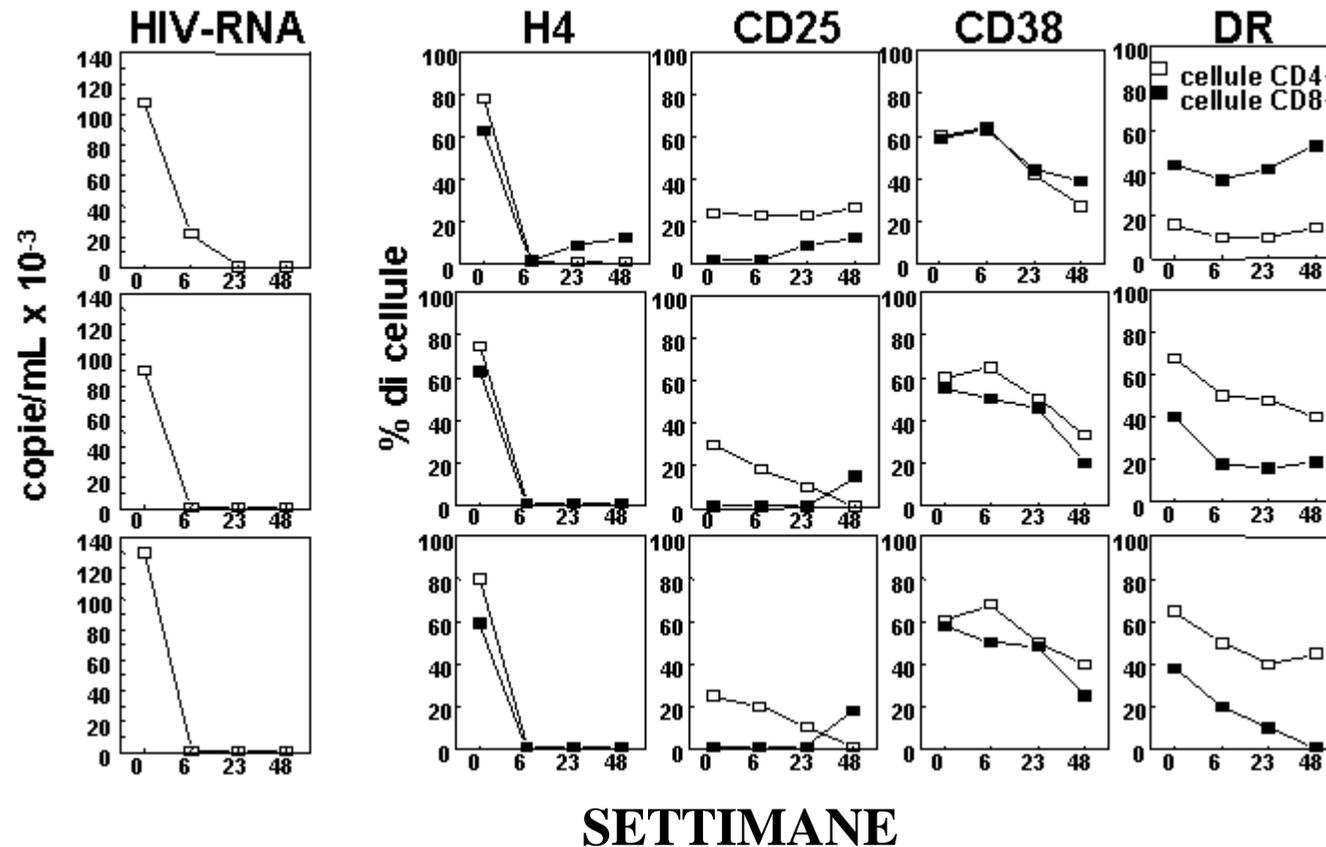


Fig. 8 Andamento dell'espressione di H4/ICOS in tre pazienti IP-precoci. I risultati sono espressi come proporzione di PBMC CD4⁺ e CD8⁺ esprimenti i marcatori di attivazione H4/ICOS, CD25, CD38 e HLA-DR analizzati a tempi diversi. Il tempo t=0 corrisponde alla prima analisi in concomitanza con l'inizio del trattamento con terapia HAART. Il pannello di sinistra mostra i livelli plasmatici di HIV-RNA a tempi diversi.

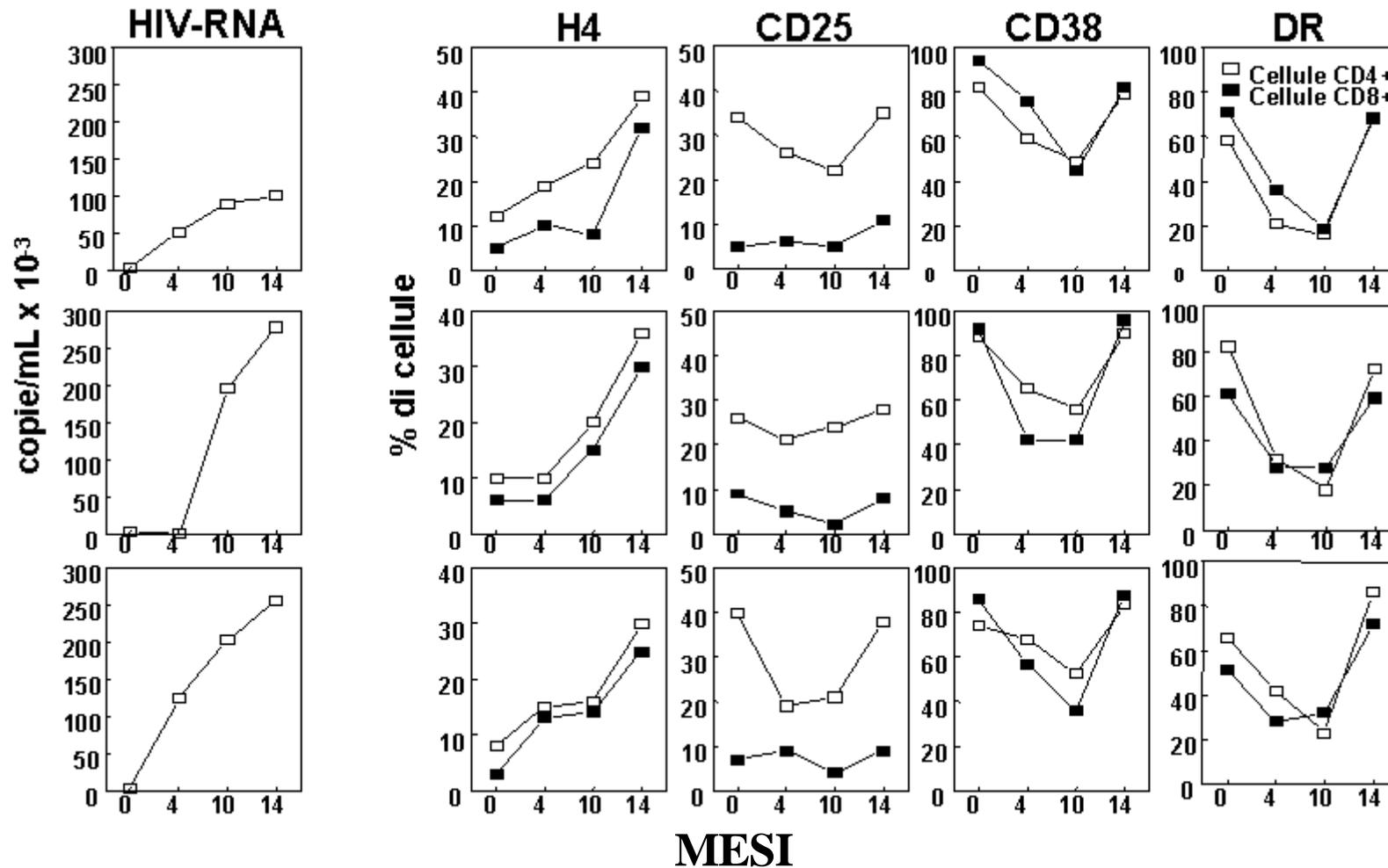


Fig. 9 Cinetica di espressione di H4/ICOS in tre pazienti con AIDS. I risultati sono espressi come percentuale di PBMC CD4⁺ e CD8⁺ esprimenti i marcatori di attivazione H4/ICOS, CD25, CD38 e HLA-DR analizzati in tempi successivi. Il tempo t=0 corrisponde alla prima analisi e mostra il fallimento della terapia HAART (livelli di HIV-RNA superiori a 500 copie/ml). Il pannello di sinistra mostra i livelli plasmatici di HIV-RNA a tempi diversi.

3.4.2 *Correlazione funzionale tra la glicoproteina di HIV-1 gp120 e H4/ICOS*

L'osservazione che l'espressione di H4/ICOS in pazienti HIV⁺ correla con l'andamento della viremia suggerisce che l'espressione della molecola sulla superficie cellulare possa essere direttamente indotta dalla presenza di prodotti virali. Tale possibilità è stata investigata valutando in vitro gli effetti della glicoproteina dell'involucro virale gp120 sulla espressione di H4/ICOS. Cellule mononucleate di sangue periferico ottenute da donatori sani sono state coltivate in presenza o assenza di gp120_{IIIIB} ricombinante (10µg/ml) per tre giorni e la cinetica di espressione di H4/ICOS è stata valutata mediante citofluorimetria. Questi esperimenti hanno dimostrato che l'incubazione con gp120 induce in modo significativo una espressione transitoria di H4/ICOS sui linfociti CD4⁺. Una simile induzione era anche osservabile sui linfociti CD8⁺, ma non sono stati raggiunti valori statisticamente significativi. Allo stesso modo gp120 sembrava anche indurre l'espressione di CD38, CD25, e HLA-DR nelle cellule CD4⁺ e CD8⁺, ma senza che venissero raggiunti valori statisticamente significativi rispetto ai controlli non trattati con gp120 (**Fig. 10**). Inoltre gp120 non induceva affatto l'espressione di altre molecole di attivazione quali CD137, CD95L e CD44v (dati non mostrati).

In passato abbiamo dimostrato che il trattamento con gp120 delle cellule T CD4⁺ potenzia l'associazione del CD4 con il complesso CD3/TCR e ne induce l'associazione con altri recettori di superficie [75, 76]. Poiché H4/ICOS presenta un certo grado di associazione laterale spontanea con CD4 e con il complesso CD3/TCR, abbiamo valutato se gp120 modificasse tali associazioni laterali. Abbiamo saggiato l'effetto di gp120 derivate da diversi ceppi virali (gp120₄₅₁, gp120_{MN}, e gp120_{IIIIB}) sulle associazioni laterali di H4/ICOS attraverso esperimenti di cocapping condotti su

Linfociti T CD4⁺ attivati con PHA ottenuti da donatori sani. I linfociti sono stati trattati per 30' in presenza o meno delle diverse gp120.

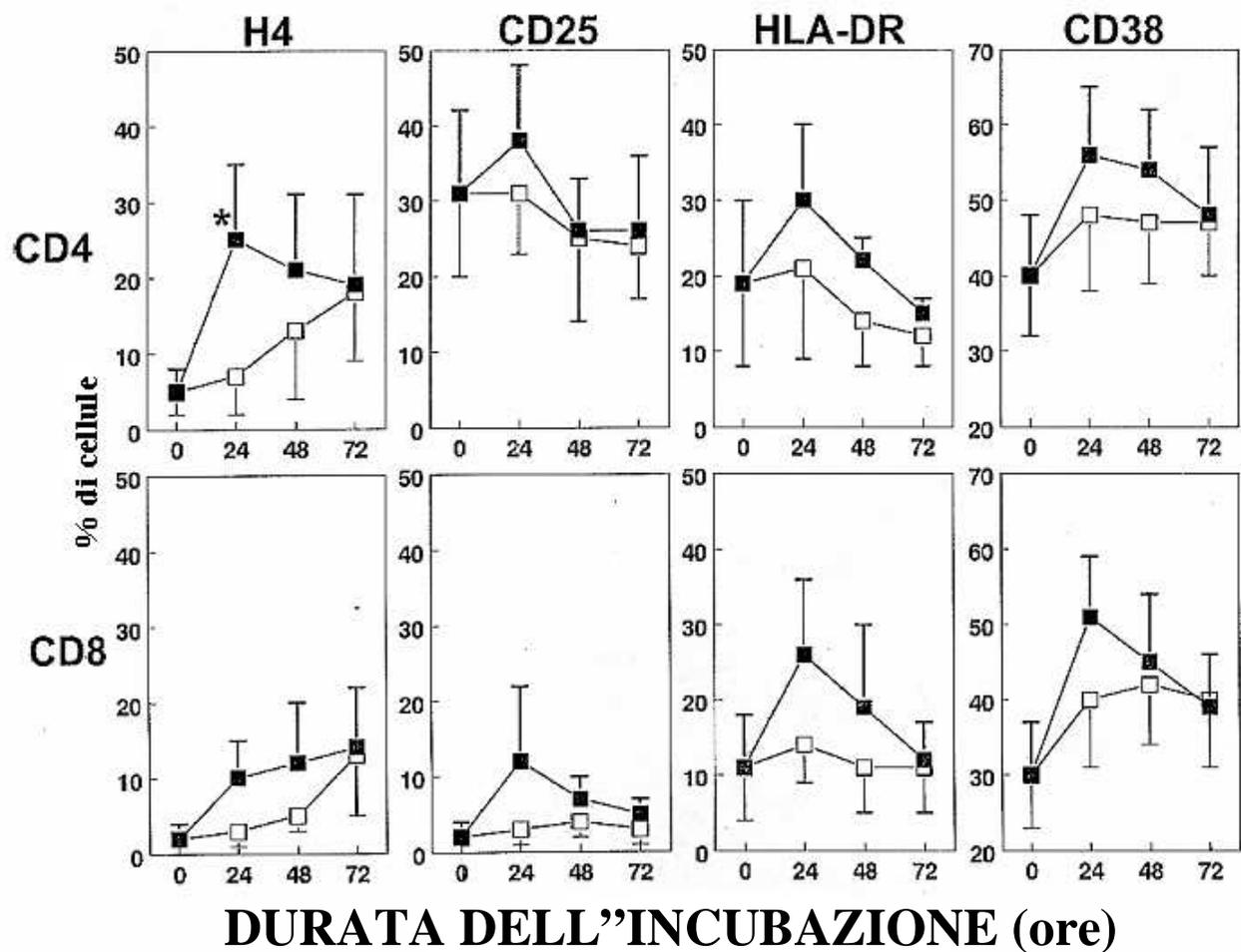


Fig. 10 Espressione di marcatori di attivazione su PBMC ottenuti da donatori sani coltivati per 72h in presenza o in assenza di prodotti virali. PBMC freschi sono stati coltivati per 72h in presenza (simboli neri) o in assenza (simboli bianchi) di gp120_{HB} e colorati con mAb diretti verso le molecole indicate. La colorazione e' stata condotta come descritto in *Materiali e Metodi*. I risultati sono espressi come percentuale di cellule CD4⁺ (pannello superiore) e cellule CD8⁺ (pannello inferiore) esprimenti i marcatori a tempi diversi. I dati sono la media di 10 esperimenti. L'asterisco indica il valore significativamente differente rispetto al controllo (test non parametrico di Mann-Whitney: p<0.05).

Successivamente è stato indotto il capping di CD4 e si è valutato il cocapping di H4, CD3, CD31 e CD71. Si è così osservato che tutte le gp120 impiegate potenziano il cocapping del CD4 con CD3 e H4/ICOS. L'effetto era specifico in quanto le gp120 non inducevano nessuna associazione del CD4 con le molecole di controllo CD71 e CD31 (Tab. 4).

Molecola che da' cocapping	CTR	gp120_{IIIIB}	gp120_{MN}	gp120₄₅₁
H4/ICOS	35 ± 22 ^a	58 ± 28 ^b	54 ± 23 ^b	54 ± 29 ^b
CD3	41 ± 1 ^{5a}	67 ± 18 ^b	65 ± 23 ^b	61 ± 16 ^b
CD71	15 ± 4	14 ± 5	16 ± 10	18 ± 7
CD31	9 ± 8	9 ± 7	8 ± 7	5 ± 5

Tab. 4 Capping di CD4 e co-capping di diverse molecole di superficie in linfociti CD4⁺ attivati con PHA e trattati o no con gp120 derivate da diversi ceppi virali. (a): i risultati sono espressi come percentuale di linfociti CD4⁺ che hanno mostrato co-capping con le molecole evidenziate. I risultati rappresentano la media ± D.S. di dati derivati da cinque esperimenti; (b): differenze significative rispetto al controllo (test di Mann-Whitney).

Numerosi autori hanno dimostrato la capacità di gp120 di indurre morte cellulare programmata in cellule T CD4⁺ e che questa è probabilmente innescata attraverso un meccanismo dipendente dall'interruttore di apoptosi Fas (CD95) [5, 77-81]. Dal momento che H4/ICOS possiede un'attività costimolatoria sulle cellule T [82] e molte molecole costimolatorie hanno un'attività protettiva nei confronti dell'apoptosi indotta da vari stimoli, abbiamo valutato l'effetto della stimolazione via H4/ICOS sull'apoptosi indotta da prodotti virali. A tal fine, linfociti T CD4⁺ preparati da donatori sani e attivati con PHA sono stati trattati con gp120_{MN} o gp120₄₅₁ o con un mAb anti-CD95 in

presenza ed in assenza del mAb anti-H4 ed è stata quindi valutata la sopravvivenza cellulare dopo 24 ore. La **Fig. 11** mostra che sia le gp120 sia l'anticorpo monoclonale anti-Fas inducevano una marcata perdita cellulare e che la stimolazione di H4/ICOS inibiva parzialmente questo effetto apoptotico.

L'effetto era specifico in quanto non era indotto dalla stimolazione di una molecola di controllo come MHC di classe I.

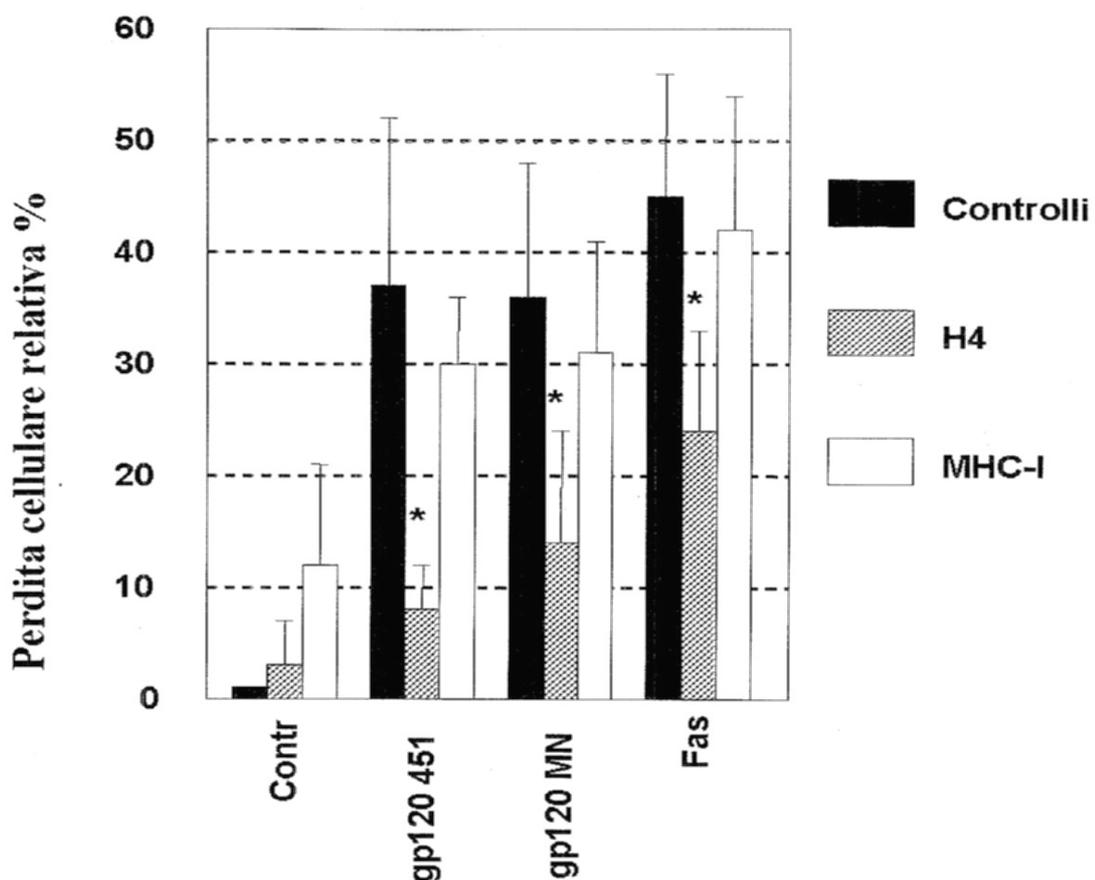


Fig. 11 Il legame dell'anticorpo anti-H4/ICOS protegge i linfociti T CD4⁺ dalla MCP indotta in vitro da gp120 o mAb anti-Fas. Le cellule sono state incubate con gp120₄₅₁, gp120_{MN}, o mAb anti-Fas in presenza o assenza dell'mAb anti-H4/ICOS o anti-MHC-I. Dopo 24 ore in coltura la sopravvivenza cellulare è stata valutata con il test di esclusione al blu tripano. I risultati sono espressi come perdita cellulare relativa %, come indicato in *Materiali e Metodi*, e rappresentano la media \pm DS dei dati ottenuti in cinque esperimenti. L'asterisco indica i dati che sono significativamente diversi rispetto al controllo (cioè cellule trattate con il corrispondente agente inducente MCP in assenza degli mAb per H4/ICOS o MHC-I).

3.5 DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo valutato l'espressione della molecola attivatoria H4/ICOS nel corso dell'infezione da HIV-1 e il suo ruolo come marcatore della progressione della malattia.

Abbiamo osservato che H4/ICOS, ma anche HLA-DR e CD38, sono espressi dai linfociti T CD4⁺ e CD8⁺ sia durante la fase dell'infezione primaria sia durante gli ultimi stadi dell'infezione, quando si manifesta il drammatico crollo dei linfociti T CD4⁺ circolanti e lo sviluppo di AIDS conclamato. Diverso appare invece il comportamento di CD25, che marca non solo i linfociti attivati ma anche i linfociti Treg, la cui espressione nella fase di AIDS conclamato è simile a quello dei controlli, mentre nell'infezione primaria è significativamente ridotta. Questa osservazione potrebbe indicare un'inibizione selettiva da parte del virus sull'espressione di CD25 o una riduzione selettiva del numero di linfociti Treg.

Sebbene questi studi trasversali non abbiano evidenziato nessuna peculiarità di ICOS rispetto a CD38 e HLA-DR, la successiva valutazione longitudinale della cinetica d'espressione di questi marcatori nel corso dell'infezione primaria e in corso di fallimento della terapia HAART ha invece dimostrato che l'espressione di H4/ICOS è sostanzialmente differente da quella degli altri due marcatori. Infatti, in entrambe le condizioni di malattia, l'espressione di H4/ICOS è quella che segue più da vicino (con una correlazione diretta) l'andamento della viremia, mentre l'espressione di HLA-DR e CD38 presenta una latenza decisamente maggiore.

Poiché vari prodotti di HIV (come gp120, Tat o Nef) sono in grado di indurre una parziale attivazione linfocitaria, si può proporre che l'elevata espressione di H4/ICOS possa dipendere da un'azione diretta di prodotti virali sui linfociti T. Questa possibilità è confermata dalla nostra osservazione che l'incubazione in vitro di linfociti T

(prelevati da soggetti non infetti) con gp120 induce entro poche ore un'espressione transiente di H4/ICOS nei linfociti CD4⁺ in assenza di altri stimoli attivatori. Questa azione potrebbe dipendere dalla stimolazione di CD4 da parte di gp120. Più difficile è invece spiegare l'induzione di una debole espressione di H4/ICOS anche nei linfociti CD8⁺, privi di CD4; in questo caso si può suggerire che l'espressione possa essere indotta da fattori prodotti dai linfociti CD4⁺, oppure dall'interazione di gp120 con corecettori virali (ad esempio recettori chemochinici o glicosfingolipidi) espressi anche dai linfociti CD8⁺.

L'espressione di H4/ICOS potrebbe proteggere i linfociti T dall'azione tossica dei diversi prodotti virali e eventualmente del virus stesso inibendo l'apoptosi e quindi la deplezione dei linfociti CD4⁺. Questa possibilità è suggerita dalla osservazione che la stimolazione di ICOS protegge i linfociti dall'apoptosi indotta in vitro da gp120 o da anticorpi anti-Fas. Questa attività protettiva potrebbe essere legata al "signaling" di ICOS oppure a un'interferenza esercitata a livello della interazione tra gp120 e CD4 dall'associazione laterale di ICOS a CD4.

La possibilità che ICOS possa intervenire direttamente nei processi di infezione è sostenuta dalla recente osservazione, fatta da altri autori, che la stimolazione di ICOS (mediante anticorpi monoclonali o una forma solubile del suo ligando fisiologico) inibisce l'infezione cellulare da parte di ceppi sia CXCR4-tropici che CCR5-tropici del virus; questa azione inibitoria richiede il "signaling" da parte di ICOS in quanto è inibita da suoi inibitori farmacologici e sembra agire prevalentemente a livello delle primissime fasi dell'infezione, probabilmente a livello dell'ingresso del virus nella cellula.

In conclusione, diversi profili di espressione di ICOS, CD38 e HLA-DR sembrano caratterizzare le varie fasi dell'infezione da HIV: nelle prime fasi dell'infezione

primaria, H4/ICOS e' espresso ad alti livelli, mentre l'espressione di CD38 e HLA-DR aumenta in una fase più tardiva; nella fase asintomatica sono presenti bassi livelli di H4/ICOS ed intermedi di CD38; infine, nella fase di AIDS conclamato, sono osservabili livelli intermedi di espressione di H4/ICOS ed elevati livelli di CD38 e HLA-DR.

La riduzione dell'espressione H4/ICOS e la diminuzione dei livelli plasmatici degli RNA virali sono la prima risposta ai trattamenti antiretrovirali con gli inibitori delle proteasi nelle fasi precoci dell'infezione da HIV; questo suggerisce quindi che l'espressione di H4/ICOS possa essere utilizzata come parametro per monitorare la risposta biologica dell'organismo in seguito a specifici trattamenti anti-HIV.

Inoltre i dati di questo lavoro, insieme a quelli di Zhou et al, suggeriscono che l'induzione dell'espressione di H4/ICOS potrebbe modulare direttamente l'evoluzione dell'infezione. Da un lato, H4/ICOS potrebbe avere un effetto protettivo sulla deplezione dei linfociti CD4+ inibendo l'apoptosi dei linfociti CD4+ e la loro infezione. Dall'altro lato questi stessi effetti potrebbero favorire il virus, inibendo la morte dei linfociti infettati e ostacolando la superinfezione cellulare. Anche l'azione funzionale di H4/ICOS sui linfociti T helper potrebbe avere un duplice ruolo. Da un lato la stimolazione della secrezione di IL10 e la "spinta" verso la differenziazione di tipo TH2 potrebbe favorire il virus, riducendo l'"help" nei confronti della risposta antivirale cellulo-mediata; dall'altro lato studi recenti (Mesturini, osservazione personale) indicano che nell'uomo, ICOS indurrebbe non solo la secrezione di IL10, ma anche (e prevalentemente) la produzione di elevati livelli di IFN-gamma, il quale potrebbe avere un positivo effetto di stimolo dell'immunità antivirale.

4. RUOLO DI FAS NELLA RITARDATA PROGRESSIONE DELL'IMMUNODEFICIENZA DA HIV-1

4.1 Il sistema Fas

4.1.1 La superfamiglia dei recettori del TNF (TNFR)

Fas appartiene alla superfamiglia del Recettore del *Tumor Necrosis Factor* (TNFR) [84-87]: essa comprende piu' di 20 membri che sono caratterizzati da un dominio extracellulare che contiene da 1 a 6 domini ricchi in cisteina (CDR) e comprende molecole come i recettori -1 e -2 del TNF (TNFR-1 e -2), il recettore per *Nerve Growth Factor* (NGF), CD40, CD27, CD30, 4.1BB ed i recettori per TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing ligand) DR4 e DR5. I ligandi di queste molecole, invece, appartengono alla superfamiglia di TNF, che comprende TNF, FasL, linfotossina (LT), CD40L, CD27L, CD30L, 4.1BBL e TRAIL.

Questi recettori possono essere divisi in due gruppi, in base alle funzioni delle loro code citoplasmatiche:

- il primo gruppo comprende i recettori di morte, come Fas, TNFR1 ed i recettori di TRAIL (quali DR4/TRAILR-1, DR5/TRICK-2/KILLER/TRAILR-2, DcR1/LIT/TRID/TRAILR-3, DcR2/TRUNDD/TRAILR-4 e OPG) [88]. Essi sono caratterizzati nella loro coda citoplasmatica da un motivo citoplasmatico, denominato "death domain" (DD), che funziona come sito di attracco, tramite il DD presente su proteine adattatrici, per interazioni omotipiche. La proteina adattatrice di Fas e' FADD (Fas-Associated Death Domain), che e' in grado di legarsi a pro-caspasi-8 attraverso il dominio DED (Death Effector Domain). Il reclutamento di procaspasi-8 porta alla formazione di un complesso trimolecolare chiamato *Death Inducing Signaling Complex*

(DISC), che attiva caspasi 8 e dà inizio alla cascata di trasduzione del segnale. Nel TNFR1, il DD è anche in grado di associarsi con un'altra molecola adattatrice, TRADD (TNFR1-associated death domain protein), che è in grado di reclutare tre mediatori, FADD, RIP1 (receptor-interacting protein 1) e TRAF2 (TNFR-associated factor 2). Così come nella via di segnalazione di Fas, FADD attiva la cascata caspatica ed innesca l'apoptosi. Al contrario, RIP1 e TRAF2 mediano l'attivazione cellulare e promuovono l'infiammazione attraverso l'attivazione di NF-κB e delle MAPK.

- Il secondo gruppo comprende la maggior parte dei recettori "TNFR-like" che agiscono principalmente come fattori di crescita. Essi non hanno un DD, ma presentano una sequenza consenso per le proteine TRAF. Lo stimolo del TNFR2 porta al coinvolgimento di TRAF2, che si associa con TRAF1. Sia TRAF1 sia TRAF2 possono reclutare c-IAP1 e c-IAP2 che presentano un'attività anti-apoptotica, essi sono infatti in grado di inibire l'attività di molte caspasi. Tuttavia, l'associazione di c-IAP1 con il TNFR2 è in grado di potenziare l'apoptosi innescata da TNF, innescando l'ubiquitinazione e la degradazione di TRAF2 [89].

4.1.2 Fas: struttura e suo ruolo nella cascata apoptotica

CD95 (APO-1/Fas) è una glicoproteina di membrana appartenente alla superfamiglia dei recettori per il TNF/NGF, nel sottogruppo dei recettori di morte [90, 91]. Fas è caratterizzato, nella porzione extracellulare, da 3 domini ricchi in cisteine (CRDs); nella porzione intracellulare è invece presente un DD, importante per la trasmissione del segnale apoptotico. L'interazione di Fas, assemblato in forma trimerica, con un trimero di FasL (CD95L) [92] innesca la cascata di segnali che portano alla morte apoptotica della cellula. L'attivazione di Fas porta alla formazione del DISC [93] in seguito al reclutamento della molecola adattatrice, FADD [94, 95] che media

l'interazione fra Fas e la procaspasi 8 (*Flice*) [96-98] (**Fig. 12**). Attraverso un processo auto-catalitico si ottiene l'attivazione di caspasi 8 che porta alla produzione della forma attiva, che viene rilasciata nel citosol come etero-tetramero.

Caspasi-8 attivata innesca 2 distinte vie apoptotiche: la via estrinseca, che procede attraverso la cascata apoptotica, e la via intrinseca, che richiede l'intervento del mitocondrio. La prima e' prevalente nelle cellule dette di "tipo I", la seconda nelle cellule dette di "tipo II".

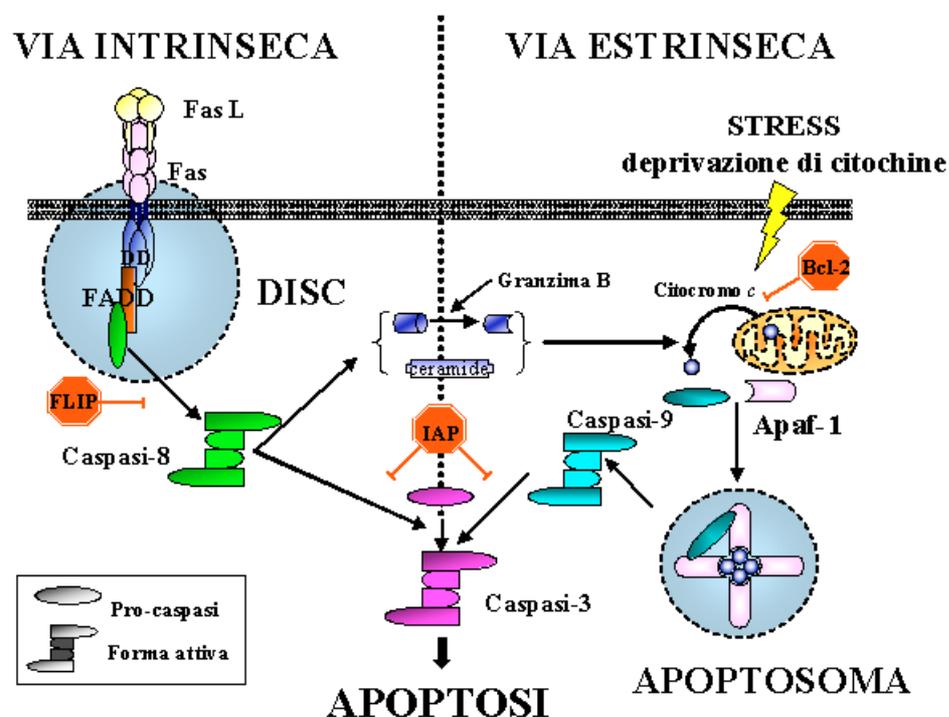


Fig. 12 La cascata di trasduzione di segnale innescata dai recettori di morte: vie intrinseca ed estrinseca. La via estrinseca e' innescata dal legame del ligando al recettore di morte e porta all'attivazione di caspasi-8; la via intrinseca, invece, e' innescata da alterazioni mitocondriali che causano il rilascio di citocromo c e l'attivazione di caspasi-9. Entrambe le vie convergono su caspasi-3. L'attivazione di caspasi-8 puo' anche causare l'attivazione della via intrinseca scindendo la forma citosolica di Bid e rilasciando tBid o attivando una sфингомielinasi acida e producendo ceramide.

Nelle cellule di tipo I, la caspasi 8 (e forse la 10), detta caspasi “iniziatrice” attiva le caspasi “esecutrici” 3, 7, 6, le quali intervengono in varia misura sui diversi aspetti della morte cellulare programmata [99, 100]. Nelle cellule di tipo II caspasi 8 scinde Bid, che appartiene alla famiglia di Bcl-2; la forma scissa di Bid attiva la via mitocondriale (**Fig. 13**). Il mitocondrio ‘attivato’ rilascia nel citoplasma SMAC/Diablo e citocromo c, che, insieme con pro-caspasi 9 e Apaf1, formano un complesso chiamato *apoptosoma*, che porta all’attivazione di caspasi 9. Questa attiva quindi altre caspasi che si trovano a valle e che propagano il segnale apoptotico (**Fig. 12**) [101].

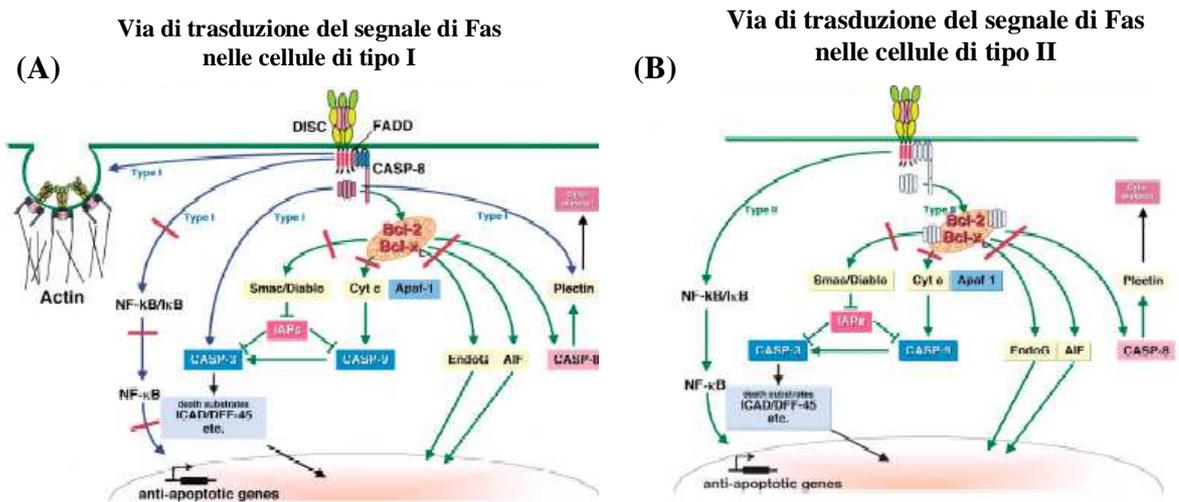


Fig. 13 Illustrazione delle due vie di trasduzione del segnale innescate da CD95. (A) Nelle cellule di tipo I, grandi quantità di caspasi 8 sono attivate dalla formazione del DISC, in grado di scindere diversi substrati. (B) Nelle cellule di tipo II, il legame di CD95L a Fas porta alla produzione di piccole quantità di caspasi 8; queste cellule dipendono dall’amplificazione del segnale da parte del mitocondrio, il quale rilascia nel citosol fattori in grado di attivare caspasi 9 ed in ultima analisi caspasi 3.

4.1.3 Inibitori del signaling di Fas

Queste vie di trasduzione del segnale sono sotto il controllo di tre famiglie di inibitori che agiscono a diversi livelli: la famiglia di Bcl-2, la famiglia di FLIP (FLICE Inhibitor Protein) e la famiglia delle IAP (Inhibitor Of Apoptosis).

La famiglia del Bcl-2 comprende diverse molecole con azione anti-apoptotica (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Blf-1, NR-13 and Diva) o pro-apoptotica (Bax, Bcl-XS, Bak, Bad, Bok) [102-105]. Molecole come Bcl-2 e Bcl-XL, con azione anti-apoptotica, risiedono nella membrana mitocondriale esterna, mentre le molecole con azione pro-apoptotica possono essere presenti sia nel citosol sia nella membrana mitocondriale. Durante l'apoptosi, i membri pro-apoptotici della famiglia vengono attivati.

Le IAP comprendono una serie di proteine (c-IAP1, c-IAP-2, X-IAP, N-IAP, survivina), che agiscono inattivando varie caspasi. Tra queste la più studiata e dotata di attività pro-apoptotica più potente è *X-IAP* (il suo gene è sul cromosoma X), che inibisce le caspasi 3 e 9 [106-110].

FLIP è stato inizialmente identificato come proteina virale (vFLIP); gli omologhi cellulari FLIPS e FLIPL condividono con caspasi 8 un'elevata omologia di sequenza e posseggono un dominio DED funzionale che può legarsi al DED di FADD competendo per lo stesso sito con caspasi 8. Queste molecole sono prive di attività enzimatica e sono in grado di inibire il processamento di procaspasi 8, sviluppando un'azione dominante negativa sulla caspasi stessa.

4.1.4 Difetti nella funzionalità di Fas: ALPS

Anomalie ereditarie, in grado di rendere il sistema immunitario incapace di eliminare i linfociti capaci di riconoscere antigeni self, possono causare malattie autoimmunitarie sia nell'uomo sia nel topo.

Topi *lpr/lpr* e *gld/gld* sono stati la prima dimostrazione di un quadro autoimmune/linfoproliferativo con accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari e presenza di autoimmunità. Entrambi i ceppi di topo presentavano inoltre un accumulo di linfociti negativi per gli antigeni di superficie CD4 e CD8 (linfociti DN).

Nell'uomo è stata descritta una condizione simile ai topi *lpr* denominata *Sindrome Autoimmune/Linfoproliferativa* (ALPS) [111-114]. I pazienti, in genere in età pediatrica, presentano una diminuita funzione della cascata di trasduzione del segnale di Fas e manifestazioni autoimmuni severe che coinvolgono principalmente le cellule del sangue (variabili associazioni di anemia, trombocitopenia, neutropenia, ma anche glomerulonefrite e vasculite). Infatti, i criteri che oggi classicamente per diagnosticare l'ALPS includono **1)** una linfoproliferazione non neoplastica, con linfadenopatia e/o splenomegalia, **2)** una ridotta risposta apoptotica dei linfociti che in seguito a trattamento con anticorpi anti-Fas, **3)** una percentuale $\geq 1\%$ di linfociti T doppi negativi (DNT) per CD4 e CD8 ($CD4^-CD8^-TCR\alpha\beta^+$) nel sangue periferico o la presenza di cellule DNT nei tessuti linfatici e **4)** la presenza di autoimmunità e/o di autoanticorpi e una storia familiare di ALPS [115].

Il difetto funzionale di Fas è dovuto a mutazioni deleterie a carico del gene di Fas (**ALPS-Ia**) [116] o di FasL (**ALPS-Ib**) [117] oppure a mutazioni del gene che codifica per caspasi 10 (**ALPS-II**) [118]. Queste mutazioni comportano una ridotta funzionalità della caspasi ed interferiscono con la cascata apoptotica. Un ulteriore sottogruppo è rappresentato dai pazienti **ALPS III** per i quali il difetto apoptotico è dovuto ad

mutazioni sconosciute nella cascata di trasduzione del segnale. Recentemente, e' stata descitta una mutazione a carico del gene che codifica per caspasi 8 che risulta in una ridotta apoptosi linfocitaria ed omeostasi ma, diversamente dagli altri pazienti ALPS, e' presente anche un difetto di attivazione sia nelle cellule T sia B e NK, cui consegue l'immunodeficienza [119, 120].

Il nostro gruppo ha identificato pazienti che presentano un quadro clinico simile a quello ALPS, ma mancante della presenza di cellule doppie negative per CD4 e CD8 [121]. Tuttavia essi presentano una diminuita funzionalita' di Fas senza presentare mutazioni a carico di Fas o FasL. McKusick ha proposto la denominazione **DALD** (*Dianzani's Autoimmune Lymphoproliferative Disease*) per questa forma di malattia (OMIM ref#605233). DALD sembra essere geneticamente eterogenea: diversi geni potrebbero essere coinvolti nelle diverse famiglie e molteplici alterazioni genetiche potrebbero essere richieste per manifestare la malattia. Questo e' suggerito dall'osservazione che, spesso, entrambi i genitori dei pazienti sono sani, ma sono Fas resistenti, il che suggerisce la presenza di una componente ereditaria.

4.2 Fas nell'infezione da HIV-1

Nei pazienti con AIDS, i linfociti T non infetti tendono a andare incontro ad apoptosi spontanea e mostrano un'aumentata risposta a vari segnali di morte, come la stimolazione di Fas o del CD3/TCR (activation-induced cell death, AICD) [121, 89]. L'apoptosi coinvolge i linfociti T attivati, soprattutto CD4⁺, ma anche CD8⁺, cosa non sorprendente dato che i linfociti T quiescenti tendono a essere molto resistenti all'apoptosi indotta da vari stimoli [122-125]. L'apoptosi nei linfociti T attivati non infettati è probabilmente indotta da alcune componenti virali, come gp120, tat, nef o

vpr e potrebbe avere un ruolo nella deplezione linfocitaria che si verifica nel corso dello sviluppo dell'AIDS.

Fas sembra svolgere un ruolo chiave in questa apoptosi, ma è possibile che siano coinvolti anche altri recettori di morte [89]. Il fenomeno è stato studiato in dettaglio nel caso della gp120 la quale potrebbe agire a) innescando un "signaling" di CD4 capace di favorire le interazioni Fas/FasL, b) stimolando direttamente Fas, o c) interferendo con l'attività di altri recettori pro-apoptotici.

a) Il triggering di CD4 favorisce l'interazione Fas/FasL

Esperimenti in vitro mostrano che il legame di CD4 da parte di anticorpi o di gp120 le rende sensibili all'AICD (Activation-Induced Cell Death), innescata dalla stimolazione del TCR/CD3 [122]. Il possibile ruolo di Fas in questa azione è suggerito dal fatto che la stimolazione di CD4 non induce apoptosi linfocitaria in soggetti con ALPS, portatori di difetti funzionali di Fas [7]. Sembra che la stimolazione di CD4 eserciti un duplice effetto sul sistema Fas/FasL:

- i. up-regola l'espressione di Fas e ne aumenta la capacità di trasdurre il segnale apoptotico, diminuendo contemporaneamente l'espressione di molecole anti-apoptotiche, come Bcl-2 e Bcl-xL;
- ii. up-regola l'espressione di FasL nelle cellule Th1 e nei macrofagi, favorendo conseguentemente l'uccisione delle cellule Fas⁺. Infatti, l'effetto pro-apoptotico della stimolazione di CD4 è inibito in parte da antagonisti dell'interazione Fas/FasL.

b) Il legame di gp120 a CD4 può indurre direttamente la via di Fas

Il fatto che antagonisti recettoriali dell'interazione Fas/FasL inibiscano solo parzialmente la morte cellulare indotta da CD4 suggerisce il possibile coinvolgimento di meccanismi indipendenti da questa interazione [131]. Una possibilità è che il legame di gp120 a CD4 induca direttamente l'attivazione della segnalazione tramite Fas. Questa possibilità è suggerita dal fatto che in molti tipi cellulari la sovraespressione di Fas può innescare direttamente la trasmissione del segnale apoptotico anche in assenza di FasL, probabilmente in conseguenza dell'oligomerizzazione spontanea del recettore [93, 95]. Poiché esperimenti di FRET e di co-capping hanno dimostrato che gp120 induce associazione tra CD4 e Fas e che questa capacità correla con l'attività pro-apoptotica di gp120 derivate da diversi ceppi virali, si può proporre che questa associazione laterale sia capace di innescare direttamente la trasduzione del segnale di Fas favorendone l'oligomerizzazione [4, 76, 131] (**Fig. 14**). Una possibilità è che la stimolazione di CD4 da parte di gp120 inneschi un segnale "inside-out" capace di indurre la traslocazione di Fas nei raft lipidici della membrana (microdomini ricchi in colesterolo, che funzionano come piattaforme per la formazione di complessi proteici coinvolti nella trasduzione del segnale) oppure il suo legame al citoscheletro tramite Ezrina; infatti il reclutamento nei raft e il legame a ezrina sembrano essere eventi chiave nell'attività funzionale di Fas. Una possibilità alternativa è che la gp120 legata a CD4 interagisca direttamente anche con Fas ponendosi a ponte tra le due molecole, oppure induca modificazioni conformazionali di CD4, il quale potrebbe a sua volta interagire lateralmente con Fas; in entrambi i casi l'oligomerizzazione di CD4 indotta da gp120 causerebbe anche l'oligomerizzazione di Fas.

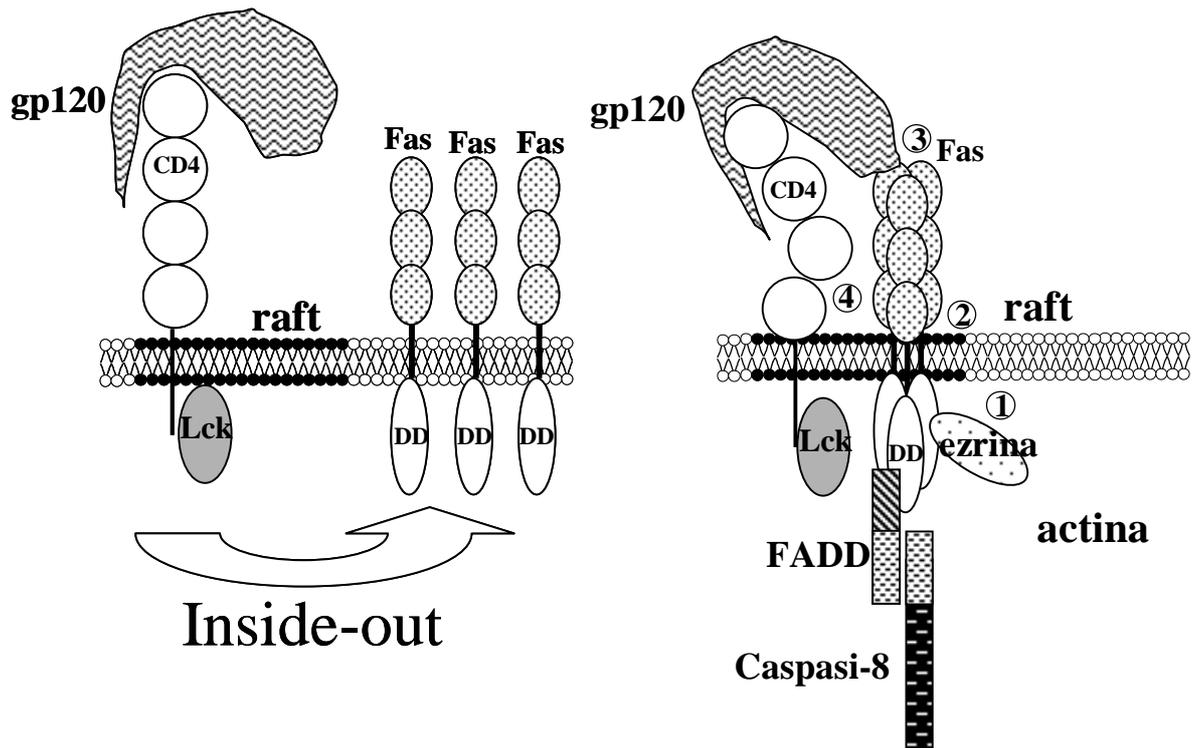


Fig 14 Stimolazione diretta di Fas indotta dal legame di gp120 a CD4. gp120 induce la co-aggregazione di Fas e CD4, questo puo' indurre l'attivazione di Fas dovuta all'oligomerizzazione di Fas stesso e alla cooperazione tra le vie di segnalazione di CD4 e Fas. La co-aggregazione Fas/CD4 potrebbe essere dovuta all'attivazione di un segnale "inside-out" che e' in grado di indurre il legame di Fas al citoscheletro attraverso ezrina (1) e/o il reclutamento di Fas nei rafts; (2) in alternativa, la co-aggregazione potrebbe essere dovuta all'associazione di CD4 e Fas, mediante gp120 che fungerebbe da ponte Fas (3), o a cambiamenti conformazionali a CD4 che porterebbero all'esposizione di siti di legame per Fas (4).

c) ruolo dei corecettori virali CCR5 e CXCR4

Arthos et al. hanno dimostrato che l'apoptosi indotta nei linfociti T CD4⁺ da parte di gp120 potrebbe coinvolgere l'interazione di gp120 con i suoi corecettori CXCR4 e CCR5 [91]. Infatti entrambi i corecettori virali sono capaci di dare un contributo al segnale apoptotico, CCR5 attraverso l'attivazione delle caspasi, CXCR4 attraverso la via mitocondriale.

4.3 Rallentata progressione dell'infezione da HIV-1 nei soggetti

“Long-term non –progressors”

L'evoluzione naturale dell'infezione da HIV porta allo sviluppo di AIDS conclamato in un arco di 2-10 anni dalla sieroconversione in circa il 85% dei soggetti infettati. Viceversa circa il 10% dei soggetti infetti evolve in AIDS prima dei 2 anni (Fast progressors), mentre il 5% non mostra segni di progressione per oltre 10 anni (long – term non progressors, LTNP).

Lo stato di LTNP sembra in alcuni casi legato alle particolari caratteristiche del ceppo virale infettante, ma in altri casi sembra imputabile a un'intrinseca resistenza del soggetto infettato. Le ragioni di questa resistenza devono ancora essere chiarite del tutto, ma e' stato suggerito che un ruolo possa essere svolto in alcuni casi da varianti alleliche dei corecettori virali CCR5 e CCR2 e della chemochina SDF1, il ligando del corecettore virale CXCR4. Infatti i polimorfismi CCR5 Δ 32, SDF1-3'A e CCR2-64I di questi geni sono significativamente più frequenti nei soggetti LTNP rispetto alla popolazione generale e sono stati associati con una ridotta funzionalità del rispettivo corecettore virale [126-130]. Tuttavia questi polimorfismi non esauriscono il problema dei meccanismi causali della condizione LTNP in quanto una elevata percentuale di soggetti LTNP non è portatore di questi polimorfismi.

4.4 Scopo del lavoro

Questo lavoro è stato effettuato per valutare se una ridotta funzionalità di Fas possa avere un ruolo nella rallentata progressione della immunodeficienza propria dei soggetti LTNP. Infatti poiché Fas sembra essere coinvolto nella deplezione dei linfociti CD4+ nel corso della malattia, un suo difetto funzionale potrebbe rallentare questa deplezione. I nostri risultati dimostrano che circa il 50% dei soggetti LTNP presentano una difettosa risposta dei linfociti alla stimolazione di Fas, contro il 2% circa dei soggetti di controllo. Il difetto non sembra dipendente dal ceppo del virus infettante, ma sembra invece avere una componente ereditaria, che potrebbe essere un nuovo fattore genetico capace di ritardare la progressione della malattia.

4.5 Materiali e Metodi

4.5.1 Pazienti

I pazienti “long term non-progressor” (LTNP) e “non-progressor” (NP) erano pazienti asintomatici che presentavano una conta di linfociti T CD4⁺>500/μl ed un titolo virale, in assenza di una terapia antiretrovirale, non rilevabile dal momento della sieroconversione rispettivamente da più di 10 anni e da 5-10 anni. I pazienti “progressor” (PR) erano pazienti asintomatici che avevano avuto una rapida diminuzione del numero dei linfociti T CD4⁺ e una viremia in crescita (200-300 CD4⁺/μl e un numero di copie virali >50.000/μl in un periodo di tempo minore di 5 anni dalla sieroconversione); l’AIDS conclamato è stato diagnosticato in accordo con i criteri del Centers for Disease Control di Atlanta, USA. La sieropositività è stata definita come presenza nel siero di anticorpi diretti verso il virus, valutati mediante ELISA e Western Blot.

4.5.2 Cellule e analisi immunofenotipica

PBMC umani sono stati isolati da preparazioni di sangue periferico tramite centrifugazione su gradiente di densità (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway). L’espressione delle molecole di superficie è stata valutata mediante immunofluorescenza diretta ed analisi citofluorimetrica (FACSscan, BD, San Jose’, CA, USA). A questo scopo sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali (mAb): anti-CD3 (Leu-4), -CD4 (Leu3a), -CD8 (Leu2a), -TCRαβ (Becton Dickinson), -Fas (Immunotech, Marseilles, France). I linfociti DN per CD4 e CD8 sono stati ricercati mediante doppia immunofluorescenza, utilizzando un mAb anti-TCRαβ FITC e dei mAbs anti-CD4 e -CD8 coniugati PE. L’espressione di Fas è stata valutata su linfociti T quiescenti e attivati, invece, mediante doppia immunofluorescenza utilizzando i

mAbs anti-CD3 PE e anti-Fas FITC (Chemicon, Temecula, CA). L'espressione di Fas e' stata calcolata come rapporto delle intensita' mediane di fluorescenza (MFI-R) in tutti i linfociti secondo la seguente formula:

$$\text{MFI-R} = \frac{\text{MFI dell'istogramma del campione (unita' arbitrarie)}}{\text{MFI dell'istogramma del controllo (unita' arbitrarie)}}$$

4.5.3 Saggio di Morte Cellulare

La morte cellulare indotta dalla stimolazione di Fas o dalla ceramide C2 e' stata valutata su linee cellulari T ottenute da PBMC attivati con 1 µg/ml (t=0) e 0.1 µg/ml (t=15) di PHA e coltivate in RPMI 1640 + 10% FBS + 2.5U/ml di rIL-2 (Biogen, Geneva, Switzerland). La funzione di Fas e' stata valutata 6 giorni dalla seconda stimolazione (t=21 di coltura). Le cellule sono state incubate con terreno di controllo o un mAb anti-Fas (CH11, isotipo IgM) (1 µg/ml) (UBI, Lake Placid, NY, USA) in presenza rIL-2 (1U/ml) per minimizzare la morte cellulare spontanea. La sopravvivenza cellulare e' stata valutata 18 ore dopo contando le cellule vive in ciascun pozzetto mediante il test di esclusione con il Tripan Blue. Le stesse condizioni sono state utilizzate per valutare la morte cellulare indotta da metil-prednisolone (PDN) (100 µM) o C2-ceramide (N-acetil-D-sfingosina) (50µM) (Sigma, S. Louis, MO USA). Le cellule di due controlli sani sono state incluse nei test come controlli positivi. I risultati sono stati espressi come sopravvivenza cellulare relativa percentuale, calcolati secondo la seguente formula:

$$\left. \left\{ 100 - \left[\frac{\text{totale delle cellule vive nel pozzetto del test}}{\text{totale delle cellule vive nel pozzetto del controllo}} \right] \right\} \right\} \times 100$$

Il limite superiore di normalita' per la morte cellulare in risposta ad anticorpi anti-Fas, a C2-ceramide e a PDN e' stato definito come media + 2 DEV.ST. dei dati ottenuti da 68 controlli sani; le risposte tra la media + 1 DEV.ST. e la media + 2 DEV.ST. sono state definite come "border line".

Nelle linee cellulari ibride, la morte cellulare indotta dagli anticorpi anti-Fas e' stata valutata mediante l'utilizzo del kit Annexin-V Fluos (Boeringer, Gmbh, Germany). In breve, 10^6 sono state colorate con annessina V e Ioduro di Propidio (1 $\mu\text{g/ml}$) in 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 ed analizzate al citofluorimetro selezionando la regione delle cellule Propidio negative.

Le linee cellulari ibride sono state prodotte mediante fusione cellulare con PEG tra linee cellulari T attivate con la PHA ed una linea continua T HUT-78. Le cellule fuse sono state selezionate in terreno RPMI 1640 + 10% FBS + anti-Fas (1 $\mu\text{g/ml}$).

4.5.4 Fusione somatica

Le cellule HUT-78 (linea T linfoide umana) sono state fuse mediante PEG (polietilenglicole) con i linfociti T di 3 i pazienti LTNP, della madre del LTNP-10 e con i linfociti T di soggetti sani. Dopo un giorno la coltura è stata messa sotto pressione selettiva con 1 $\mu\text{g/ml}$ di mAb anti-Fas e 50 μM ceramide fino alla morte delle cellule di controllo (HUT-78 da sole), anch'esse fuse.

4.5.5 *Analisi genica*

La ricerca delle mutazioni nel gene di Fas e' stata effettuata mediante un'analisi SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e sequenziamento del cDNA .

L'RNA totale e' stato estratto da PBMC freschi con il kit Ultraspec (Biotex, Houston, Texas, USA). 2µg di RNA totale sono stati utilizzati come stampo per la sintesi di cDNA. L'intera sequenza codificante per il gene di Fas e' stata amplificata in un unico frammento di 1114 bp. La PCR e' stata effettuata utilizzando 25 pmol di ciascun primer e un quarto della reazione di sintesi del cDNA. Il sequenziamento del cDNA e' stato effettuato con il kit di sequenziamento Dye Terminator (Applied Biosystem, Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) utilizzando un sequenziatore automatico ABI Model 373A.

I polimorfismi CCR5Δ32, SDF1-3'A e CCR2-64I sono state analizzate come precedentemente riportato (74-77).

L'RNA provirale e' stato ricercato mediante PCR, utilizzando primer per le sequenze conservate di gag, LTR/gag o pol. Come controllo, nello stesso tubo di reazione e' stato amplificato il gene *bax*.

4.6 Risultati

4.6.1 Ruolo di Fas nella progressione dell'infezione da HIV-1

In questo lavoro abbiamo valutato la possibilità che un difettoso funzionamento di Fas possa ritardare la progressione dell'infezione da HIV. Abbiamo perciò valutato la suscettibilità dei linfociti T derivati da 18 soggetti LTNP e di 4 soggetti NP (non progressor) alla morte cellulare indotta dalla stimolazione di Fas. Quattro soggetti HIV⁺ PR asintomatici, 9 pazienti con AIDS conclamato e 68 soggetti sani sono stati utilizzati come controlli. Abbiamo anche valutato la risposta dei linfociti T di questi soggetti ad altri due stimoli: C2-Ceramide (Cer), la cui via di induzione dell'apoptosi è parzialmente sovrapponibile a quella di Fas e Prednisolone (PDN), che induce morte cellulare in modo indipendente da Fas. Lo studio è stato condotto su linee cellulari T coltivate per 21 giorni, dato che è in questo stadio che esse mostrano, nei soggetti di controllo, la maggiore sensibilità alla morte cellulare Fas-indotta. Inoltre questa cultura a lungo termine permetteva di minimizzare gli effetti che i prodotti di HIV potevano avere esercitato in vivo sul sistema di Fas [98-105].

Il nostro studio ha evidenziato che la morte cellulare indotta da Fas e Ceramide era significativamente ridotta nei soggetti LTNP e NP rispetto ai soggetti di controllo, ai soggetti PR e con AIDS conclamato (**Fig. 15** e **Tab. 5**). Al contrario, la morte cellulare indotta dalla stimolazione di Fas era significativamente più elevata nei soggetti PR e con AIDS rispetto ai soggetti di controllo, mentre quella indotta dalla Ceramide era più elevata nei soggetti con AIDS rispetto ai controlli. Infine, la morte cellulare indotta da PDN era paragonabile in tutti i gruppi analizzati.

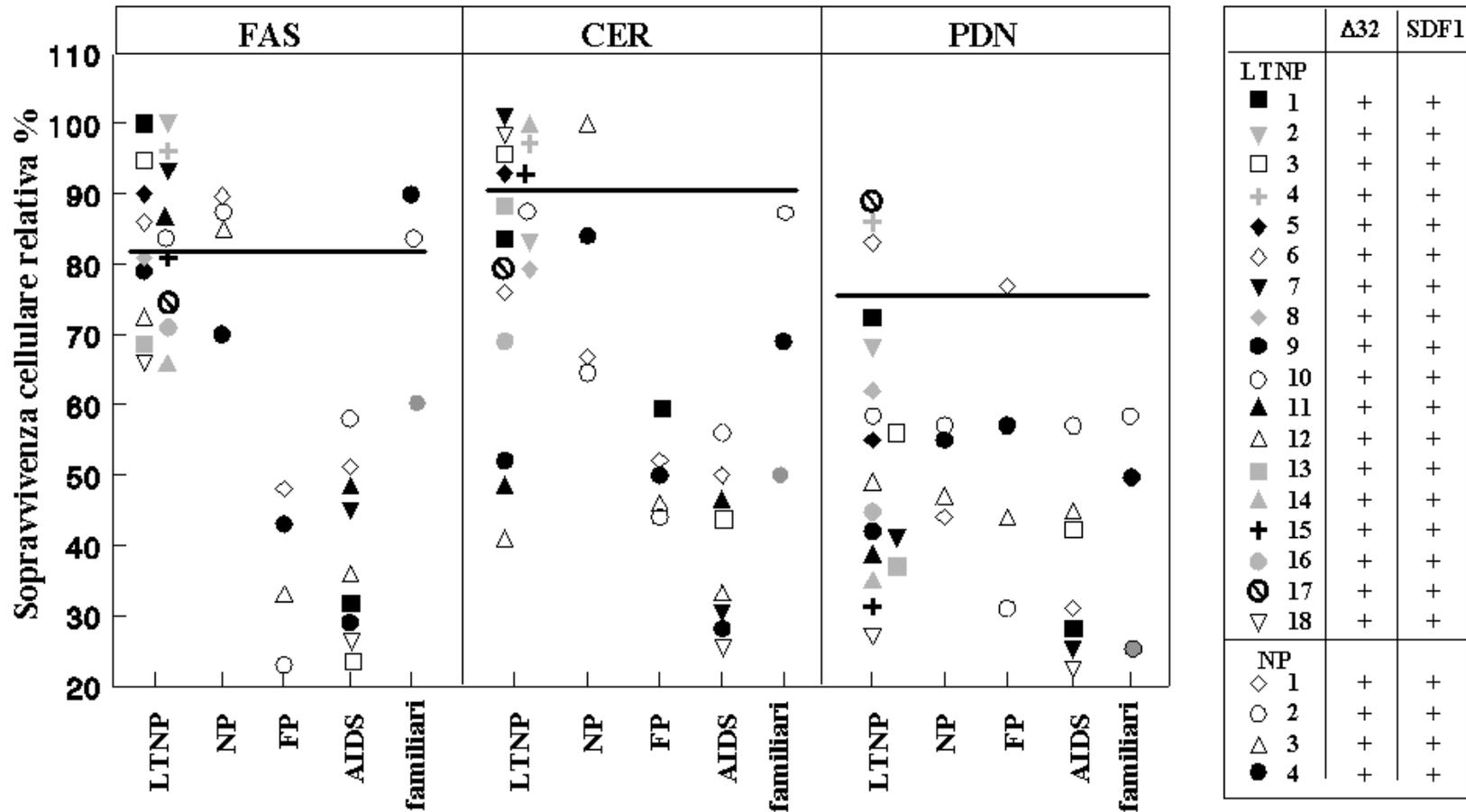


Fig. 15 Morte cellulare indotta da Fas, Ceramide e PDN in diversi gruppi di pazienti HIV⁺ e un gruppo di soggetti di controllo. Le linee cellulari, coltivate per 21 giorni, sono state trattate come descritto in Materiali e Metodi e la sopravvivenza cellulare e' stata valutata dopo 18 ore. I risultati sono espressi come sopravvivenza relativa percentuale. Ciascun membro di un gruppo e' sempre rappresentato con lo stesso simbolo. Le linee orizzontali rappresentano il numero superiore di normalita' Il pannello di destra mostra I pazienti LTNP ed I NP che sono omozigoti (ho) o eterozigoti (he) o che non mostrano polimorfismo nei geni per CCR5-D32 (R5), SDF-1-3'A (SDF1) e CCR2-64I (R2); (-) = non valutato.

controlli	n ^a	mAb anti-Fas		ceramide		PDN	
		Sopravv. cellulare relativa	n. di resistenti (%) ^c	Sopravv. cellulare relativa	n. di resistenti (%) ^c	Sopravv. cellulare relativa	n. di resistenti (%) ^c
controlli	68	60±11	2 (3%)	58±16	2 (3%)	49±13	3 (4%)
LTNP	18	81±11 ^{^*o}	9 (50%) ^{^o}	81±18 ^{^*o}	7 (39%) [^]	54±19	3 (17%)
NP	4	81±8 ^{^*o}	3 (75%) [^]	79±16 ^{^*o}	1 (25%)	51±6	0 (0%)
FP	4	37±11 [^]	0 (0%)	48±4	0 (0%)	52±19	1 (25%)
AIDS	9	38±12 [^]	0 (0%)	40±12 [^]	0 (0%)	37±15	0 (0%)

a: numero di soggetti in ciascun gruppo

b: i risultati sono espressi come media ± DS della sopravvivenza cellulare relativa % rivelata dopo 18 hr di incubazione con i reagenti indicati

c: i risultati sono espressi come numero (percentuali tra parentesi) dei soggetti resistenti in ciascun gruppo alla morte cellulare indotta dagli stimoli indicati.

[^] valori significativamente differenti rispetto ai controlli (la sopravvivenza cellulare relativa e' stata analizzata con il test di Mann-Whitney, il numero dei soggetti resistenti con i test esatto di Fisher)

^{*} valori significativamente differenti rispetto ai soggetti FP (test Mann-Whitney)

^o valori significativamente differenti rispetto ai soggetti AIDS (test Mann-Whitney)

Tab. 5: Morte cellulare indotta da anticorpi anti-Fas, ceramide, and PDN in soggetti sani di controllo and e nei diversi gruppi di pazienti.

Analizzando i singoli soggetti possiamo dire che 12/18 soggetti LTNP e 3/4 NP erano resistenti alla morte indotta da uno dei due stimoli, in particolare, 4 soggetti LTNP e 1 NP erano resistenti ad entrambi gli stimoli, 5 LTNP e 2 NP erano resistenti solo alla morte cellulare indotta dalla stimolazione di Fas, e 3 LTNP erano resistenti solo a Ceramide. Al contrario, nessun soggetto PR o con AIDS e' risultato resistente a Fas o Ceramide. La resistenza alla morte cellulare indotta da PDN e' stata riscontrata solo in 3 soggetti LTNP, di cui 1 solo soggetto era anche resistente a Fas e Ceramide, 1 soggetto era resistente solo a Fas e 1 solo a Ceramide). L'analisi statistica di questi risultati ha dimostrato che la frequenza di resistenza a Fas era significativamente piu' elevata nei LTNP (9/18) rispetto ai controlli (2/68) e ai soggetti con AIDS (0/9), e nei NP (3/4) rispetto ai controlli; inoltre la frequenza di resistenza alla ceramide era

significativamente più elevata nei LTNP (7/18) rispetto ai controlli (2/68). Al contrario, la frequenza di resistenza a PDN non era aumentata in modo statisticamente significativo in nessun gruppo di pazienti. Va anche sottolineato che 6/9 dei soggetti LTNP che non sono risultati resistenti all'apoptosi indotta da Fas mostravano una risposta "border-line" molto vicino al limite superiore di normalità.

Per valutare se la ridotta risposta apoptotica fosse dovuta a una ridotta espressione di Fas, abbiamo confrontato l'espressione di Fas nei linfociti T dei soggetti Fas resistenti e in controlli sani Fas-sensibili mediante immunofluorescenza diretta e analisi citofluorimetrica. L'analisi è stata effettuata su linee T coltivate a lungo termine con lo stesso protocollo utilizzato per preparare i linfociti per la valutazione della funzione di Fas. Questa analisi ha dimostrato che l'espressione di Fas nei soggetti Fas-resistenti non era diversa rispetto ai soggetti di controllo (dati non mostrati).

Poiché la condizione di LTNP è stata associata ai polimorfismi CCR5-Δ32, SDF1-3' e CCR2-64I dei geni dei corecettori virali CCR5, CCR2 e del ligando SDF1 del corecettore CXCR4 [94-97, 112, 113] abbiamo ricercato questi polimorfismi in 12 pazienti LTNP e 1 paziente NP per valutare se loro presenza correlasse con la Fas-resistenza. I dati mostrati nella **Fig. 15** hanno escluso la presenza di correlazioni tra Fas-resistenza e questi polimorfismi.

Abbiamo quindi indagato se la Fas-resistenza dei soggetti LTNP fosse causata da difetti genetici ereditari simili a quelli coinvolti nello sviluppo dell'ALPS.

Per prima cosa abbiamo valutato la funzionalità di Fas in parenti di primo grado non infetti di alcuni soggetti LTNP: la madre della paziente LTNP-10 e entrambi i genitori del paziente LTNP-9 (entrambi i pazienti mostravano una risposta "border-line" alla stimolazione di Fas); tutti i genitori erano sani. Come si può osservare dalla **Fig. 16**, la madre del paziente LTNP-10 era resistente alla morte cellulare indotta da Fas ed il

padre del paziente LTNP-9 presentava una risposta “border-line”; al contrario, le cellule derivate dal figlio della paziente LTNP-10 e dalla madre del paziente LTNP-9 mostravano una normale risposta alla stimolazione di Fas. Questa osservazione suggerisce che il difetto abbia una componente ereditaria e sia indipendente dall’infezione.

Poiché nei soggetti con la variante DALD dell’ALPS è stata dimostrata in passato la presenza di molecole con azione dominante negativa sulla funzione di Fas [86, 87], abbiamo valutato se queste molecole fossero presenti anche nei soggetti LTNP Fas-resistenti. Abbiamo quindi fuso i linfociti T derivati da 3 soggetti LTNP e dalla madre Fas-resistente di LTNP-10 con cellule HUT-78, una linea T continua Fas-sensibile. Dopo la fusione le cellule ibride sono state coltivate in presenza di anticorpi anti-Fas per indurre l’apoptosi delle cellule Fas-sensibili. Tutte queste fusioni hanno dato origine a linee ibride Fas-resistenti, che non sono state invece ottenute quando le HUT-78 erano fuse con linfociti T Fas-sensibili ottenuti da controlli (**Fig. 17**). Nelle cellule ibride la resistenza all’apoptosi non era dovuta a HIV in quanto questo era apparentemente del tutto assente nelle cellule ibride; infatti ripetuti tentativi di amplificare, mediante PCR, i geni di HIV per *gag*, *pol* e per le Long Terminal Repeats (LTR) hanno sempre dato risultati negativi (dati non mostrati). Inoltre, la fusione effettuata tra la linea HUT-78 e linee Fas-sensibili derivate da 3 pazienti con AIDS, 2 pazienti PR e 10 controlli sani non ha dato mai origine a linee ibride Fas-resistenti, mentre la fusione con linfociti Fas-resistenti derivati da 5 pazienti autoimmuni non infetti da HIV ha generato linee ibride Fas-resistenti (dati non mostrati).

Poiché nei pazienti con ALPS la Fas-resistenza si associa a mutazioni del gene di Fas e all’espansione dei linfociti T DN, abbiamo valutato questi parametri anche nei soggetti LTNP Fas-resistenti. La ricerca dei linfociti T DN nel sangue periferico mediante

immunofluorescenza e citofluorimetria non ha evidenziato l'espansione di queste cellule in nessun soggetto (i T DN erano sempre <1%). Similmente nessuna mutazione del geni di Fas è stata evidenziata da una ricerca di mutazioni mediante analisi SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) e sequenziamento degli esoni e delle porzioni introniche prossimali (dati non mostrati).

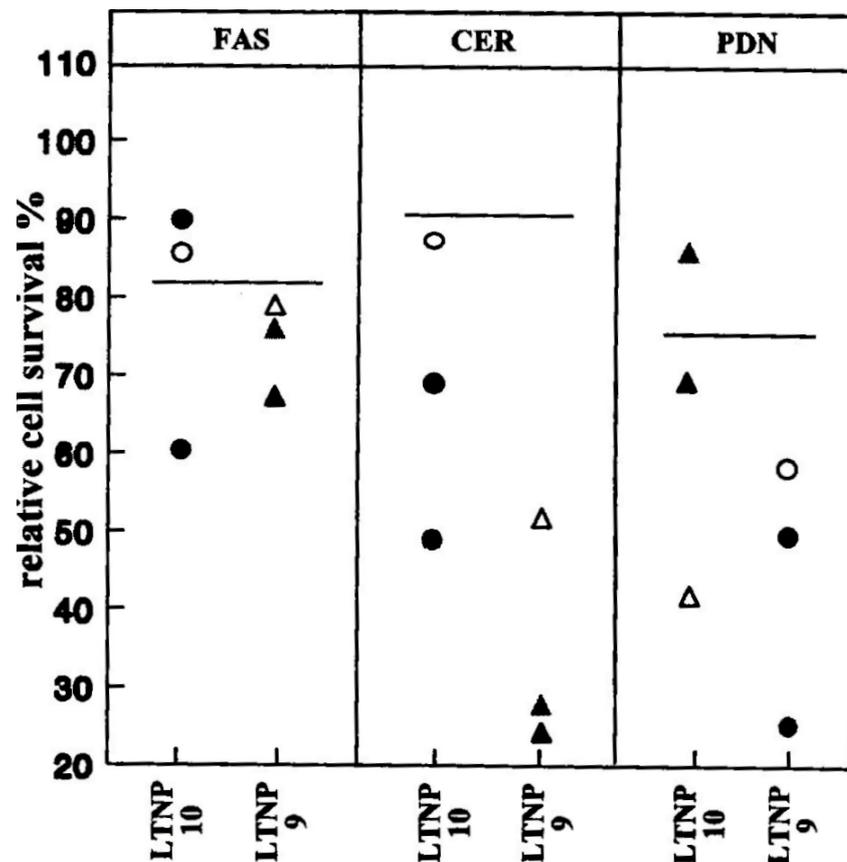


Fig. 16 Morte cellulare indotta da Fas, Ceramide e PDN nei parenti sani dei pazienti LTNP-10 e LTNP-9. L'analisi è stata effettuata sul paziente LTNP-10 (○), sulla madre sana (●) e sul figlio (●), e sul paziente LTNP-9 (△), sulla madre sana (▲) e sul padre (▲). Gli esperimenti sono stati effettuati ed espressi come descritto in Fig. 19.

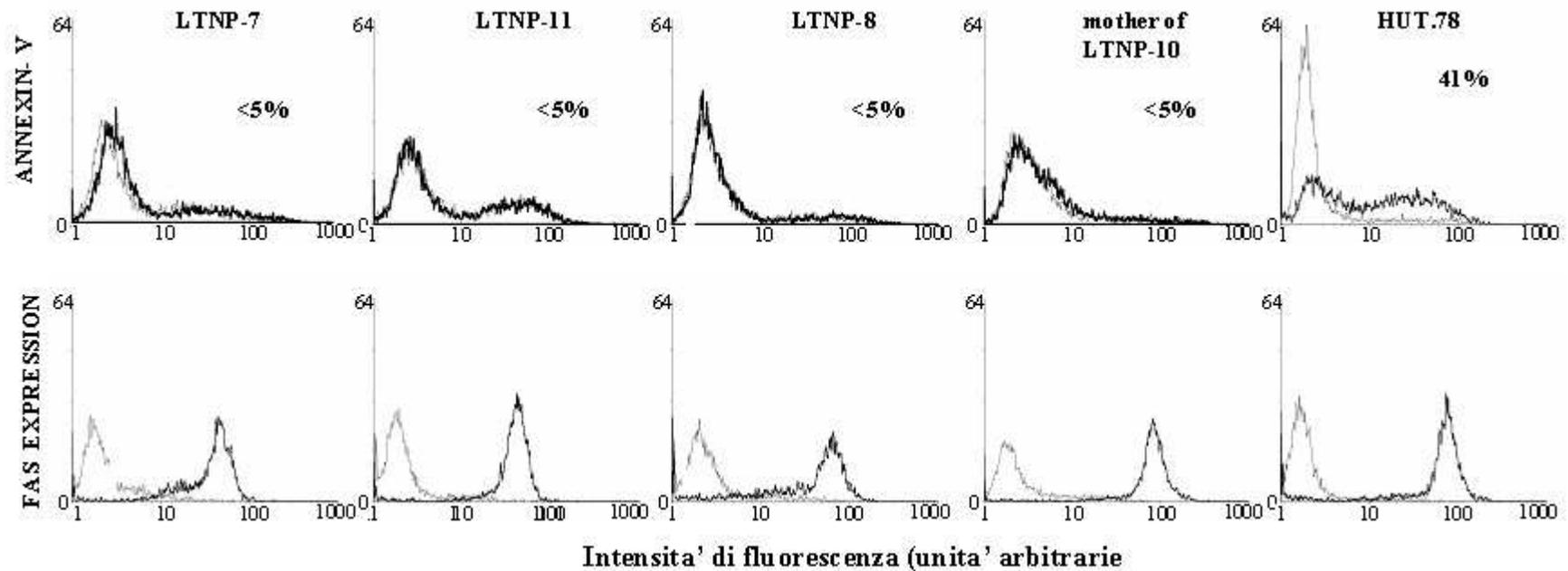


Fig. 17 Morte cellulare in risposta all'attivazione della via di segnalazione di Fas e Espressione di Fas stesso nella linea cellulare HUT-78 parentale e nelle linee ibride ottenute dalla fusione della linea wt con linee T Fas-resistenti alla morte cellulare Fas-indotta. Le linee erano derivate da 3 pazienti LTNP e dalla madre sana del paziente e 10. Pannello superiore: le linee ibride, ma non la linea parentale, sono resistenti alla morte cellulare Fas-indotta, valutata 12h dalla stimolazione mediante colorazione con Annessina V e ioduro di propidio. I grafici mostrano la colorazione con Annessina V delle cellule propidio negative nelle cellule trattate con anticorpi anti-Fas (curva nera) rispetto alle cellule di controllo (curva grigia). Il numero indica la proporzione di cellule Annessina V⁺ nel campione trattato - la proporzione di cellule Annessina V⁺ nel controllo. Pannello inferiore: Le linee ibride esprimono livelli paragonabili di Fas sulla superficie cellulare rispetto alla linea HUT-78. I grafici mostrano la colorazione con anticorpi anti-Fas FITC (curva nera) rispetto al controllo negativo colorato con anticorpi dello stesso isotipo (curva grigia).

4.7 *Discussione*

Questo lavoro dimostra che i linfociti T di una considerevole proporzione di soggetti LTNP presentano una ridotta suscettibilità alla morte cellulare indotta dalla stimolazione di Fas. La ceramide utilizza una via di induzione di morte parzialmente sovrapponibile a quella di Fas, non è quindi sorprendente che una parte dei pazienti presenti resistenza ad entrambi gli stimoli [98]. Il difetto sembra essere specifico in quanto l'apoptosi indotta da metilprednisolone (PDN) non era significativamente ridotta. La funzione di Fas non era del tutto abolita nei soggetti Fas-resistenti in quanto la risposta apoptotica aumentava sia quando la stimolazione di Fas era protratta per 48h sia quando lo stimolo dato dall'anticorpo anti-Fas era potenziato incrementando il "crosslinking" del recettore mediante anticorpi anti-Ig (dati non mostrati).

Questo studio non può escludere che la Fas-resistenza sia stata acquisita nel corso dell'infezione, in seguito ad un'azione diretta del virus o alla selezione di sottopopolazioni linfocitarie Fas-resistenti, che potrebbero essere state ulteriormente espanse durante la coltura in vitro. Tuttavia vari dati suggeriscono che questa possibilità sia improbabile e che invece la Fas resistenza possa avere una componente genetica ereditaria indipendente dall'infezione:

1) la possibilità della selezione di cloni cellulari Fas-resistenti durante le culture a lungo termine sembra esclusa dall'osservazione che il difetto è stato osservato anche in colture a breve termine (6 giorni) (dati non mostrati).

2) La possibilità che la resistenza sia dovuta all'infezione virale per sé è esclusa dall'osservazione che nei soggetti con AIDS o PR la funzione di Fas non era ridotta, ma anzi era aumentata rispetto ai controlli; questo conferma la nozione che l'infezione e vari prodotti virali sensibilizzano la funzione di Fas.

3) La possibilità che la Fas-resistenza possa essere indotta solo dai particolari ceppi di HIV infettanti i LTNP sembra esclusa dall'osservazione che la paziente LTNP-10 era stata infettata dal marito, il quale era morto in seguito a una evoluzione rapida di malattia dopo soli 5 anni dalla sierconversione (ovvero non era un LTNP).

4) Viceversa la possibilità che la Fas-resistenza abbia una componente ereditaria e sia indipendente dall'infezione è sostenuta dalla osservazione che era presente anche nella madre della paziente LTNP-10 e nel padre del paziente LTNP-9, i quali erano sani e non infettati da HIV.

5) Inoltre questa possibilità è anche sostenuta dagli esperimenti che dimostrano che il fenotipo "Fas-resistente" può essere trasmesso in modo stabile dai linfociti dei soggetti LTNP alla linea HUT78 Fas-sensibile in seguito a fusione somatica. Questo suggerisce che le cellule Fas-resistenti possiedano geni che codificano molecole capaci di un'azione dominante negativa sul sistema Fas funzionante delle HUT-78. Questi "dominanti negativi" non sono prodotti dal virus dal momento che il genoma virale non era amplificabile dalle linee ibride.

Questi dati suggeriscono che i soggetti Fas-resistenti, che presentano una ritardata progressione della malattia, possano essere portatori di alterazioni geniche simili a quelle che causano l'ALPS. Poiché non abbiamo individuato nessuna mutazione del gene di Fas nei soggetti LTNP, si può suggerire che il loro difetto funzionale sia causato da alterazioni genetiche che colpiscono la via di segnalazione di Fas a valle rispetto al recettore, come già proposto per l'ALPS-III e la DALD. Il fatto che i soggetti LTNP non presentassero nessun segno di ALPS non è sorprendente in quanto la penetranza della malattia è piuttosto modesta (i genitori dei pazienti con ALPS sono in genere sani, benché portatori del difetto funzionale di Fas).

E' ancora poco chiaro quali siano i fattori in grado di alterare il decorso "normale" dell'infezione da HIV e fattori virali e dovuti all'ospite potrebbero esserne responsabili. Come già accennato potrebbero essere coinvolte alcune molecole virali; l'esempio piu' convincente e' rappresentato da *nef*, il cui difetto potrebbe essere responsabile della ritardata progressione della malattia in alcuni soggetti LTNP. Dal punto di vista dei fattori dell'ospite è stato suggerito un ruolo per gli aplotipi HLA e per i geni del fattore complementare C4, del Tumor Necrosis Factor (TNF) o della proteina legante il mannosio (mannose binding protein, MBP) [131]. In modo più convincente vari gruppi hanno dimostrato il coinvolgimento della famiglia dei recettori delle chemochine [94-97]. I soggetti omozigoti per l'allele polimorfico CCR5-Δ32, che codifica per una forma tronca del recettore CCR5 non funzionale come corecettore virale, sono resistenti all'infezione virale; invece, soggetti eterozigoti per lo stesso polimorfismo sono solo parzialmente protetti dall'infezione virale e presentano una ritardata progressione della malattia. Similmente anche il polimorfismo 64I del gene per CCR2 e' stato associato a una ritardata progressione della malattia. L'allele SDF1-3'A del gene per SDF-1, il ligando del corecettore virale CXCR4, e' in grado di conferire un effetto protettivo recessivo nei soggetti LTNP. Tuttavia, alcuni studi evidenziano che queste mutazioni siano importanti solo in alcuni soggetti LTNP e è quindi probabile che l'evoluzione della malattia dipenda da molteplici geni in grado di lavorare in modo indipendente o di interagire con il fenotipo virale. Questo lavoro suggerisce che un ruolo nella evoluzione della malattia possa essere svolto da alterazioni genetiche a cariche della via di segnalazione di Fas che potrebbero ridurre la suscettibilità dei linfociti T CD4⁺ alla morte cellulare indotta da prodotti virali. Queste alterazioni sono indipendenti dai polimorfismi CCR5-Δ32, CCR2-64I e SDF1-

3'A e potrebbero essere un nuovo fattore che coopera nel causare una ritardata progressione della malattia.

[122] ***LA MOLECOLA CD38 INTERFERISCE CON IL PROCESSO DI INFEZIONE DA HIV-1 MEDIANTE UNA SEQUENZA OMOLOGA AL LOOP V3 DI gp120***

5.1 La molecola CD38

5.1.1 CD38: una molecola multifunzionale

Le associazioni laterali indotte da gp120 sulla superficie cellulare, oltre ad alterare il funzionamento delle molecole coinvolte, potrebbero modulare l'interazione virus/cellula ed influenzare la suscettibilità cellulare all'infezione. Tra le molecole che potrebbero avere un'azione di questo tipo CD38 era un buon candidato per due motivi:

- è uno dei più utilizzati marcatori prognostici nell'evoluzione dell'immunodeficienza da HIV;
- presenta analogie funzionali con CD44, molecola per la quale è stata proposta un'attività co-recettoriale per l'HIV.

CD38 è una glicoproteina di tipo II a singola catena transmembrana del peso di 45 kDa. La molecola è composta da un breve dominio citoplasmatico (23 aa), una regione transmembrana (22 aa), ed un lungo dominio extracellulare (259 aa), contenente quattro siti di glicosilazione ed un *heparin-binding motif* (**Fig. 18**).

CD38 umano è codificato da un gene che si estende per più di 60 kb, presente in un'unica copia, formato da otto esoni e sette introni di varia lunghezza ed espresso da cellule della linea emopoietica in modo variabile, secondo il tipo cellulare e lo stadio maturativo.

Questa molecola è espressa ad alti livelli dalle cellule mieloidi immature, non lo è più nelle forme mature, ed è nuovamente espressa dopo l'attivazione cellulare. Nella linea B è espressa dai linfociti B attivati e ad altissimi livelli dalle plasmacellule. Nella linea T è espressa a livelli gradualmente crescenti nel corso della maturazione timica ed a bassi livelli dai linfociti vergini maturi, mentre non si trova nei linfociti memoria quiescenti. L'attivazione dei linfociti T, sia vergini sia memoria, induce un'espressione molto elevata di CD38 che, per questo motivo, è considerato un buon marcatore d'attivazione. CD38 è anche presente nella maggior parte delle cellule NK, nelle piastrine e negli eritrociti.

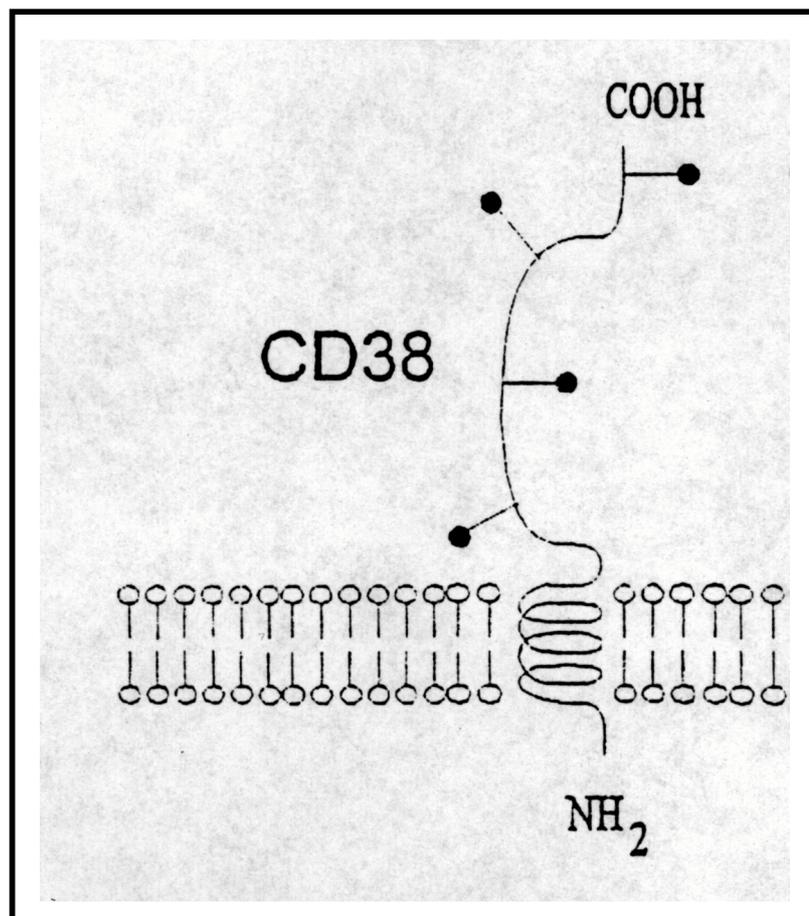


Fig. 18 Struttura del CD38 umano. CD38 è una glicoproteina di tipo II del peso di 45 kDa. La molecola è composta da una breve coda citoplasmatica (23aa), una singola regione transmembrana (22aa), ed un lungo dominio extracellulare (259aa), contenente 4 siti di glicosilazione ed un *heparin-binding motif*.

Tra i tessuti solidi, è espresso nelle isole pancreatiche, dalle cellule epiteliali prostatiche, dagli astrociti e dalle cellule di Purkinje. Altri tessuti che esprimono CD38 sono il muscolo striato e liscio, i tubuli renali e le cellule gangliari della retina.

Le funzioni attribuite a CD38 sono molto eterogenee:

- CD38 è una molecola d'adesione, infatti, si lega al recettore CD31 (espresso da leucociti e cellule endoteliali) ed è coinvolto in varie interazioni intercellulari comprese quelle tra leucociti e endotelio vascolare [132-134]. Questa molecola sarebbe, pertanto, anche un recettore di homing dei leucociti.

- CD38 possiede una funzione ecto-enzimatica: la regione extracellulare della molecola, infatti, è dotata di attività ADP-ribosil ciclasica, per cui CD38 è un ectoenzima [135]. Poiché l'ADP-ribosio ciclico (cADPR) è un secondo messaggero che agisce da mobilizzatore del calcio dalle riserve intracellulari, indipendentemente dalla via dell'inositolo trisfosfato, è stato proposto che la funzione enzimatica della molecola sia importante nella generazione di flussi di Ca^{2+} intracellulari. Quest'ipotesi tuttavia si scontra con la localizzazione extracellulare della molecola, ed è stato proposto che si potrebbe formare un omodimero di CD38 che verrebbe internalizzato e agirebbe come trasportatore di cADPR. Secondo altri ricercatori, invece, l'attività enzimatica avrebbe solamente il ruolo di *scavenger receptor*, anche alla luce di una seconda attività enzimatica della molecola, ovvero l'attività cADPR idrolasica che catalizza la degradazione del cADPR ad ADPR [136].

- CD38 trasduce segnali d'attivazione. Questa funzione non è necessariamente dipendente dall'attività ecto-enzimatica, infatti, la stimolazione di CD38 attiva una via di trasduzione tirosin-chinasica probabilmente reclutando come trasduttori del segnale altre molecole transmembrana, come CD4 nei linfociti T, il CD19 nei linfociti B o CD16 nelle cellule NK, con le quali è capace di interagire lateralmente anche grazie ai

rafts [132], microdomini presenti nella membrana plasmatica ricchi in colesterolo, glicosfingolipidi e sfingomieline. I rafts lipidici possono funzionare come piattaforme per la formazione di complessi “multicomponenti” coinvolti nella trasduzione del segnale.

5.1.2 CD38 come marcatore di evoluzione della malattia da HIV

L'espressione di CD38 è aumentata nei linfociti CD8⁺ di pazienti con AIDS.

CD38 è stato fino ad ora studiato principalmente come marcatore prognostico nell'infezione da HIV-1, infatti, l'espressione del CD38 nei linfociti periferici è elevata nel corso dell'infezione primaria, diminuisce nella fase asintomatica, e quindi aumenta nuovamente nella progressione verso l'AIDS [137]. Dal punto di vista prognostico, l'espressione di CD38 sembra avere particolare valore nei linfociti CD8. Nell'infezione primaria un aumento dei linfociti CD8⁺CD38⁺ nel sangue periferico evidenzia un'attiva ed efficace risposta citotossica contro il virus e precede la scomparsa dei sintomi e la diminuzione della viremia nell'infezione acuta. Nella fase asintomatica, viceversa, l'aumento di queste cellule segnala l'accelerazione dell'infezione ed è un marker predittivo per il declino delle cellule CD4⁺ e lo sviluppo dell'AIDS; inoltre, una rapida discesa del numero di cellule CD8⁺CD38⁺ nel sangue periferico in seguito all'instaurazione di una terapia HAART (terapia antiretrovirale altamente attiva) è un marcatore positivo dell'efficacia della terapia [138, 139]. Nei bambini è stato descritto un valore prognostico anche per l'espressione di CD38 nei linfociti CD4: in questo caso un'elevata espressione è positivamente correlata con la sopravvivenza [140, 141].

5.2 Scopo del lavoro

Scopo del lavoro era la valutazione se CD38 potesse interferire con l'infezione cellulare da parte di HIV partendo da due ordini di osservazioni:

1) Dati in vitro dimostrano che l'interazione di gp120 di HIV con CD4 induce una potente associazione laterale di CD38 a CD4 [142, 143]. Questo suggerisce che CD38, oltre ad essere un buon marcatore di evoluzione di malattia, possa anche svolgere un ruolo diretto nel meccanismo di infezione interferendo in qualche modo nell'interazione tra virus e cellula [132-146].

2) Il livello di espressione di CD38 da parte di varie linee tumorali T correla negativamente con la loro suscettibilità all'infezione in vitro da parte di vari ceppi HIV-1 X4 di laboratorio (HIV-1_{III B} e HIV-1_{p1}) e di isolati primari X4 e X4/R5 [147].

5.3 *Materiali e Metodi*

5.3.1 *Costrutti e trasfettanti*

Il cDNA di CD38 *full-length* e delle forme mutanti codificanti per tre molecole tronche, mancanti di 15, 81 e 109 aa nella porzione COOH-terminale della molecola (chiamate rispettivamente CD38₁₋₂₈₅, CD38₁₋₂₁₉, CD38₁₋₁₉₁), sono state ottenute da Hoshino et al. [148] e clonate nel plasmide pcDNA3/neo dopo digestione per mezzo degli enzimi di restrizione HindIII e NotI. Una sequenza *myc-tag* è stato aggiunta alla porzione NH₂-terminale della molecola per mezzo di PCR utilizzando il primer1 (forward) 5'- **TTTAAGCTTATGGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAGGACCTGATGGCCAACGCGAGTTC**-3' e il primer2 (reverse) 5'- **TTGAATTCACCCACCCATG** -3'. I prodotti di PCR sono stati digeriti con gli enzimi HindIII ed EcoRI e ligati nei plasmidi codificanti per il CD38 intero e per le forme tronche, a loro volta digeriti con HindIII ed EcoRI.

Il cDNA codificante per la molecola mancante della porzione intracitoplasmatica (CD38₂₄₋₃₀₀) è stato anch'esso preparato mediante PCR utilizzando il primer3 (forward) 5'- **AAGCTTATGCTCTGTCTTGGCGTCAG** -3' e il primer2. Il prodotto di PCR è stato digerito con gli enzimi HindIII ed EcoRI e ligato nel plasmide pcDNA3/CD38/neo, digerito HindIII/EcoRI.

La forma mutante CD38_{Δ52-57}, anch'essa ottenuta per PCR, è stata preparata utilizzando un primer4 specifico per CD38 (forward 5'- **GGCGCCAGACGTGGAGC*CGCTTTC** CCGAGACCGTCCT -3') mancante dei 18 nucleotidi codificanti per gli aa GPGTTK (aa 52-57) di CD38 insieme al primer2. Dopo la purificazione, i prodotti di PCR sono stati digeriti con gli enzimi NarI ed EcoRI e ligati nel plasmide pcDNA3/CD38/neo digerito NarI/EcoRI.

La presenza di eventuali mutazioni nei costrutti è stata esclusa mediante sequenziamento.

I plasmidi (10 μ g) sono stati linearizzati con l'enzima PvuI e trasfettati nell'appropriata linea cellulare (5x10⁶ cellule/0.8 ml PBS) mediante elettroporazione a 260V e 960 μ F.

5.3.2 FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

L'mAb OKT4 (ATCC) specifico per il CD4 è stato coniugato con Cy3 utilizzando il kit FluoroLink-Ab Cy3 Labeling Kit. Il successo della coniugazione è stato controllato mediante spettrofotometria e spettrofluorimetria.

Le cellule sono state lavate con PBS + 5% FBS + 0.1% NaN₃ freddo, incubate in ghiaccio per 1 ora con OKT4 coniugato con Cy3 (il fluorocromo accettore) e con un mAb coniugato con FITC (il fluorocromo donatore) specifico per la molecola di cui si voleva valutare l'associazione con CD4 (nel nostro caso CD38). Quindi, le cellule sono state lavate, risospese in PBS + 0.1% NaN₃ ed analizzate immediatamente.

Un citofluorimetro FACScan è stato utilizzato per valutare il trasferimento di energia da FITC al Cy3. Il fluorocromo FITC è stata eccitato a 488nm e l'emissione Cy3 è stata raccolta ad una lunghezza d'onda >600nm. Il dato raccolto è stato convertito in canali medi di intensità di fluorescenza ed è stato usato come indicatore per la presenza (uno spostamento positivo rispetto al controllo) o assenza (nessuno spostamento o uno spostamento negativo) del trasferimento di energia.

5.3.3 Allineamenti di sequenze

Per analizzare le analogie tra la sequenza di CD38 compresa tra gli aa 45-74 (CD38₄₅₋₇₄) e le sequenze lentivirali del loop V3, sono stati allestiti allineamenti binari e multipli utilizzando, rispettivamente, software come LALIGN e DIALIGN2. Per valutare la

significatività degli allineamenti, sono state generate 1000 sequenze random con la composizione amminoacidica simile a quella del peptide CD38₄₅₋₇₄ utilizzando il software RandSeq. Queste sono state poi testate per allineamento con le sequenze del loop V3 di gp120. E' stato quindi calcolato empiricamente un valore di p, ottenuto come frazione delle sequenze che mostravano un allineamento uguale o superiore a quello ottenuto con CD38₄₅₋₇₄.

5.3.4 Saggi di binding gp120/CD4

CD4 ricombinante solubile (rshCD4) è stato adsorbito alla concentrazione di 2µg/ml a piastre da 96 pozzetti specifiche per saggi ELISA. Le piastre sono quindi state saturate con PBS+2%BSA, lavate con PBS+1%BSA+0.05% Triton X-100 ed incubate per 2h a 37°C con 100µl di PBS contenente di gp120 (0-10µM) coniugata con Biotina. Dopo 6 lavaggi, la piastra è stata incubata per 30 min. a temperatura ambiente con streptavidina-HRP (1µg/ml). Successivamente, dopo 6 lavaggi, la piastra è stata incubata con 100µl di soluzione di sviluppo, preparata a partire da tavolette di OPD sciolte in tampone citrato. Dopo 30 min. di incubazione la reazione è stata bloccata con acido solforico 1N e le piastre sono state lette a $\lambda=450\text{nm}$.

5.3.5 Linee Cellulari

I PBMC sono stati purificati da sangue periferico di donatori sani mediante centrifugazione su gradiente di Ficoll. Le cellule sono state coltivate in RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Gaithersurg, MD) + 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco Life Technologies, Gaithersurg, MD), a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ alla concentrazione di 5×10^5 cellule/mL.

Le linee cellulari HeLa e MT4 sono state coltivate rispettivamente in DMEM (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD) + 10% FBS e RPMI 1640 + 10% FBS.

Nei saggi di vitalità, attivazione ed apoptosi cellulare le colture sono state allestite in presenza o assenza del peptide sCD38₅₁₋₇₄MBP (range: 0.1-100 nM).

Sui PBMC è stata valutata l'espressione, mediante immunofluorescenza, di diversi antigeni di superficie (CD38, CD25, CD4, CD3 e CD95), per valutarne l'attivazione.

In tutte le linee cellulari sono state valutate la vitalità cellulare con il metodo del metil-tetrazolio (MTT) e l'apoptosi con la tecnica del Propidio Ioduro (PI)/Annessina V FITC.

5.3.6 Saggi Virologici

Negli esperimenti di infezione acuta sono stati usati il ceppo di laboratorio HIV-1_{IIB} e gli isolati primari HIV-1_{UG3} (sottotipo A, R5) ed HIV-1_{VI 829} (sottotipo C, R5) [144]. Gli stock virali sono stati titolati biologicamente con il metodo della diluizione limite utilizzando cellule MT-2 per il ceppo HIV-1_{IIB}, o PBMC attivati con PHA (Sigma, S.Louis, MO) alla concentrazione di 1 µg/ml per gli isolati primari. Prima dell'infezione le cellule sono state incubate per 30 min. in terreno RPMI 1640 + 2% di FBS contenente sCD38₅₁₋₇₄MBP a differenti concentrazioni (0.1-100 nM). Sospensioni virali sono state aggiunte alla sospensione cellulare in modo tale da ottenere una molteplicità di infezione (MOI) pari a circa 0.1.

La MOI rappresenta il numero di particelle virali infettanti presenti in una sospensione virale espresso come CCDI₅₀/ml (dose infettante la coltura cellulare) rapportate con il numero di cellule cimentate con detta sospensione.

Le cellule sono state mantenute in contatto con le sospensioni virali per 2h. Contemporaneamente, su cellule di controllo preincubate e non con sCD38₅₁₋₇₄MBP è

stata simulata un'infezione mantenendole per 2h nelle stesse condizioni delle cellule infettate, ma in assenza del virus. Dopo 3 lavaggi in PBS le cellule sono state risospese in un terreno di coltura appropriato RPMI 1640 con 10% FBS, IL-2 (2 U/mL) e PHA (1µg/mL), per 7 giorni a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂. I surnatanti sono stati recuperati a differenti intervalli di tempo tramite centrifugazione a 1500 rpm per 10 minuti, sono stati congelati a -80°C e raccolti per la misurazione tramite un test ELISA per la p24 virale di HIV-1 (NEN™ Life Science Product, Inc.-Boston, Ma).

5.3.7 Saggi di proliferazione

Negli esperimenti di proliferazione, i PBMC sono stati seminati in piastre da 96 pozzetti in numero di 10⁵ cellule/pozzetto in terreno RPMI 1640 con 10% di FBS, in presenza o assenza di anti-CD3 (OKT3, 1µg/ml), usato in adesione, ed in presenza o assenza di dosi crescenti di peptide sCD38₅₁₋₇₄MBP. Le cellule sono state incubate per 72 ore, e le ultime 6 ore con timidina triziata ³H-T (Amersham, Little Chalfont) (0.5µCi/pozzetto, 48Ci/mmol), quindi sacrificate ed analizzate al contatore-β.

5.3.8 Anticorpi Monoclonali

Nello studio sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali (mAbs) coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC) o Ficoeritrina (PE): anti-CD4, anti-CD3 (Coulter, Hialeah, FL), anti-CD95 (Chemicon International, Temecula, Ca), anti-CD38 (CALTAG Laboratories, Burlingame, CA), anti-CD25 (CALTAG Laboratories, Burlingame, CA). Gli appropriati mAbs dello stesso isotipo sono stati usati come controlli negativi. Le immunofluorescenze sono state quindi analizzate con un citofluorimetro FACScan.

5.3.9 *Analisi dell'attività spermicida*

12 campioni di sperma sono stati raccolti dal Centro di Fertilità della Divisione di Ginecologia dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara ed analizzati in accordo con le direttive WHO (1992); 8 derivavano da soggetti normali, mentre 4 appartenevano a soggetti astenospermici, cioè con una motilità ridotta degli spermatozoi. I campioni sono stati quindi trattati con il peptide sCD38₅₁₋₇₄MBP diluito in PBS alla concentrazione di 10 nM per circa 30 minuti a 37°C. I controlli, costituiti dagli stessi campioni di sperma, sono stati incubati con la stessa quantità di PBS senza il peptide.

i. Analisi dello Sperma

Dopo la raccolta, i campioni di sperma sono stati incubati a 37°C per 30 min. su un "orbital mixer" per raccogliere gli spermatozoi. I campioni sono stati valutati al microscopio ottico (MO) per valutarne motilità e vitalità, direttamente o dopo 15 minuti di incubazione con 10 nM di sCD38₅₁₋₇₄MBP.

Per la valutazione della vitalità cellulare, 50 µl di campione sono stati diluiti con un'uguale quantità di una soluzione di colorazione a base di Eosina-Nigrosina ed incubati per 30 sec. Quindi, con una goccia di questa soluzione è stato effettuato uno striscio su un vetrino per microscopio. Il campione è stato poi lasciato asciugare all'aria e quindi osservato al microscopio ottico. Almeno 200 spermatozoi sono stati osservati con un obiettivo 100X ad immersione. Gli spermatozoi che non erano colorati sono stati considerati vivi, mentre quelli con una colorazione da rosa a rossa sono stati considerati morti.

Per la valutazione della motilità cellulare, 6 µl di campione sono stati posti su un vetrino da microscopio e coperti con un vetrino coprioggetto; sono quindi stati

analizzati al MO in contrasto di fase. Circa 200 spermatozoi sono stati analizzati in doppio per valutarne la loro motilità.

Contemporaneamente, sono stati effettuate analisi di routine su ciascun campione come controlli interni.

5.3.10 Valutazione delle Citochine

Il sistema BD Cytometric Bead Array (BD Biosciences) consente di determinare la concentrazione di piu' citochine in un surnatante mediante il citofluorimetro FACSCalibur. In particolare il kit Human Th1/Th2 Cytokine ha permesso la contemporanea valutazione delle seguenti citochine, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α ed IFN- γ .

In breve, i surnatanti delle colture cellulari sono stati incubati con sei popolazioni di microsfere di cattura (a diverse intensità di fluorescenza in base alla citochina riconosciuta) e sei tipi di anticorpi diretti verso le sei differenti citochine; queste sono riconosciute da entrambi i reagenti, e discriminate al citofluorimetro in base al tipo e alla quantità.

Le curve standard sono state generate per ogni citochina con il reagente fornito dal kit e la concentrazione in pg/ml delle citochine nel surnatante è stata determinata tramite analisi con il CBA software.

Mediante kit ELISA commerciali abbiamo valutato le concentrazioni di CCL3, CCL4 e TNF- α presenti nei surnatanti di coltura.

5.3.1 Risultati

5.4.1 Effetti di CD38 sul processo di fusione virale

Per valutare la possibilità che CD38 interferisca con il l'infezione cellulare da parte di HIV-1 abbiamo utilizzato trasfettanti per CD38 della linea MT2, una linea T umana CD4⁺CXCR-4⁺CD38⁻. Questa linea è stata trasfettata stabilmente il cDNA del CD38 *full-length* e con il plasmide vuoto, ottenendo rispettivamente cloni cellulari esprimenti alti livelli di CD38 (MT2.CD38) e cloni mock (MT2.M). I livelli di espressione delle molecole CD4 e CXCR4 (rispettivamente recettore e corecettore di HIV) erano simili nelle due linee. Questi cloni cellulari sono stati utilizzati in esperimenti di infezione con HIV-1_{IIB} (**Fig. 19**) e in esperimenti di co-coltura con la linea cellulare H9_{IIB} (**Fig. 20**). Come si può osservare dalla figure sia i livelli di p24 virale presenti nei surnatanti di coltura, sia la formazione dei sincizi indotti da HIV-1 sono significativamente più bassi nelle cellule MT2.CD38 rispetto a quelli delle cellule MT2.M.

Per valutare se l'azione di CD38 dipendesse da una interferenza nel legame di HIV alla cellula, abbiamo valutato la capacità di gp120 di legarsi alle cellule MT2.M e MT2 incubando queste cellule con gp120_{IIB} FITC e valutando in legame mediante citofluorimetria. Questi esperimenti hanno dimostrato un legame di gp120_{IIB} molto minore nelle cellule MT2.CD38 rispetto alle cellule MT2.M (**Fig. 21**).

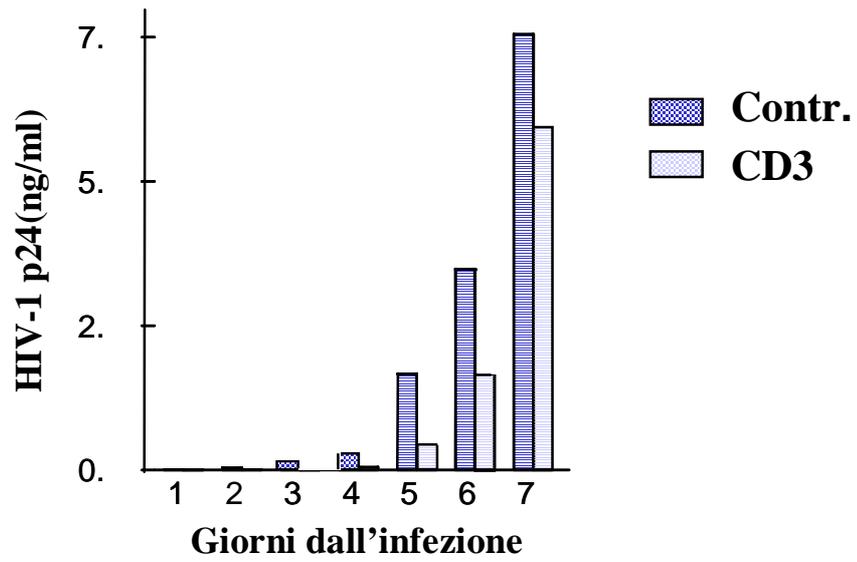
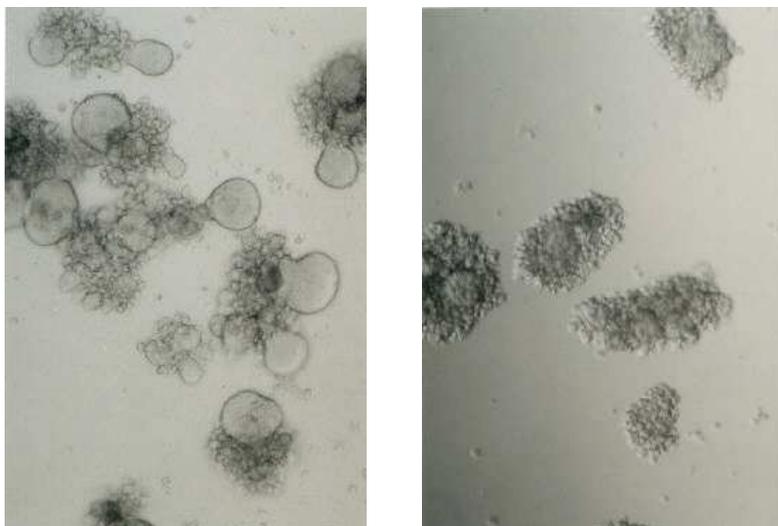


Fig. 19 Infezione con HIV-1_{IIIB}. Valutazione della p24 virale nei trasfettanti MT2.M e MT2.CD38, a diversi tempi dall'infezione.

A)



B)

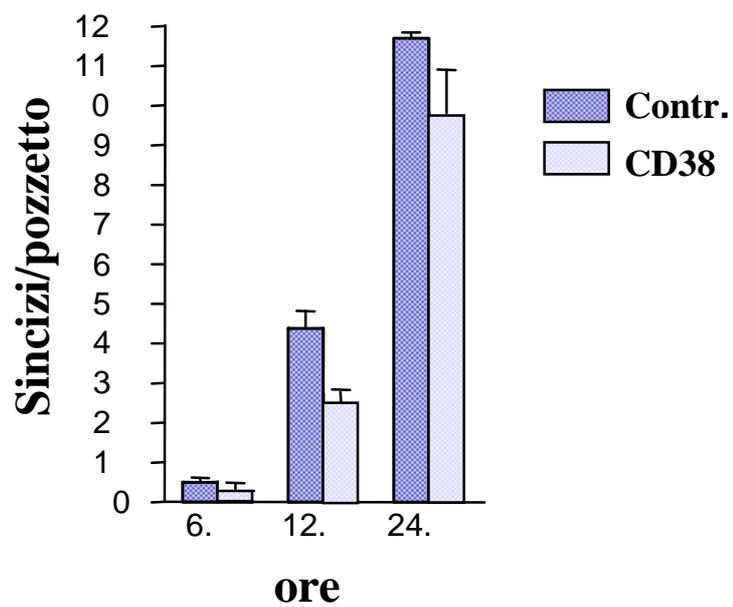


Fig. 20 Cocoltura con cellule H9_{IIB} **A)** Fotografie al M.O. (100x) che mostrano i sincizi a 12h nelle co-culture MT2.M e MT2.CD38 con le cellule H9_{IIB}; **B)** Conta dei sincizi nelle co-culture a diversi tempi dall'infezione.

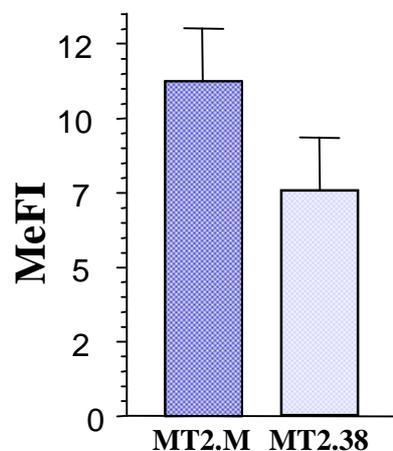


Fig. 21 Legame della gp120_{IIIB}-FITC alle cellule MT2.M e MT2.CD38

Per valutare la specificità degli effetti osservati, abbiamo paragonato l'effetto di CD38 con quello di altre molecole di superficie, che presentano (CD59 e CD95) o non presentano (CD31) associazione laterale con CD4 [150, 151]. Non avendo a disposizione linee cellulari umane prive di queste molecole, abbiamo trasfettato il cDNA di CD4 umano nella linea T murina SR.D10 ottenendo la linea SR.hCD4, che è stata quindi ulteriormente trasfettata con i cDNA delle molecole umane CD38, CD59, CD95 e CD31 ottenendo cloni cellulari (SR.hCD4.CD38, SR.hCD4.CD59, SR.hCD4.CD95, SR.hCD4.CD31) esprimenti livelli paragonabili delle diverse molecole. Questi cloni cellulari sono quindi stati utilizzati in esperimenti di *binding* di gp120 FITC. Questi trasfettanti tra l'altro permettevano di valutare i livelli di legame di gp120 FITC a CD4 in assenza di corecettori umani per HIV-1. Come si può osservare dalla **Fig. 22**, il legame di gp120 FITC è significativamente inferiore nelle cellule esprimenti CD38 rispetto a quello osservabile nelle altre linee cellulari trasfettate.

Come si può osservare dalla **Fig. 22**, il legame di gp120 FITC è significativamente inferiore nelle cellule esprimenti CD38 rispetto a quello osservabile nelle altre linee cellulari trasfettate.

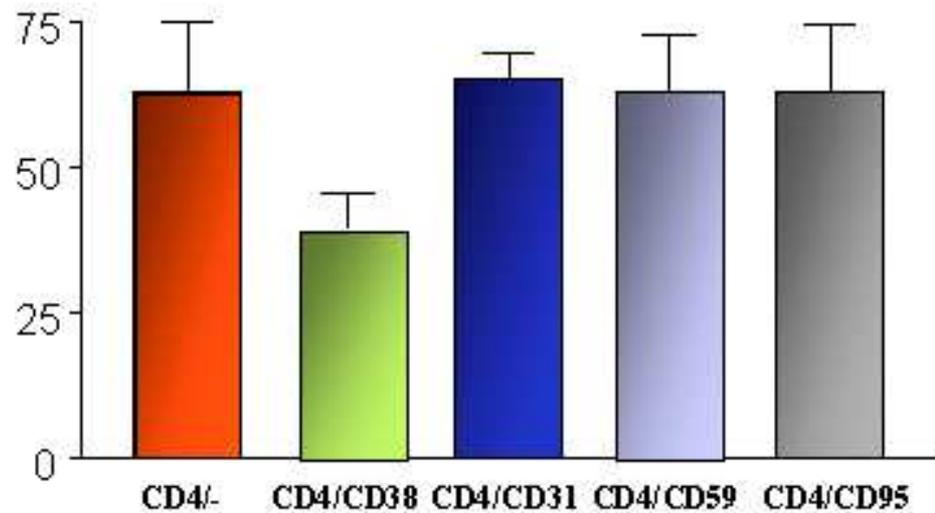


Fig. 22 Legame della gp120_{IIB}-FITC alle cellule murine SR.D10 trasfettate con CD4 umano e altri recettori presenti sulla superficie cellulare.

L'effetto di CD38 era quindi specifico in quanto non era condiviso dalle altre molecole umane trasfettate nella linea murina, ovvero CD59, CD95 o CD31.

Questi dati suggeriscono che l'espressione del CD38 moduli negativamente la suscettibilità dei linfociti alla infezione da HIV-1 CD4-dipendente, probabilmente inibendo il legame del virus al CD4 stesso. Verosimilmente questo effetto è efficace soprattutto nei linfociti T vergini, che esprimono elevati livelli di CD38, mentre è meno efficace nei linfociti attivati, che pure esprimono elevati livelli di CD38, ma up-regolano anche una serie di altre molecole che favoriscono l'ingresso del virus nella cellula e la sua replicazione [152].

Da questi risultati possiamo concludere che CD38 moduli negativamente la replicazione virale ed interferisca con la fusione del virus mediata da gp120.

5.4.2 Mappatura del dominio di CD38 coinvolto nell'inibizione dell'infezione

Abbiamo quindi deciso di identificare quale dominio di CD38 fosse responsabile degli effetti anti- HIV-1.

Con questo obiettivo abbiamo prodotto una serie di plasmidi codificanti per forme tronche di CD38 e li abbiamo trasfettati nelle cellule MT-2. In particolare abbiamo prodotto una forma priva della porzione intracellulare (IC) della molecola (CD38₂₄₋₃₀₀) e forme prive di porzioni via via maggiori dell'estremità -COOH terminale (CD38₂₄₋₃₀₀, CD38₁₋₂₈₅, CD38₁₋₂₁₉, CD38₁₋₁₉₁). Dato che alcune forme tronche mancavano degli epitopi riconosciuti dagli anticorpi α -CD38 a nostra disposizione, abbiamo aggiunto all'estremità NH₂-terminale una sequenza *myc*-tag. Analisi effettuate al microscopio confocale hanno dimostrato la localizzazione sulla superficie cellulare di tutte le forme mutanti di CD38 (dati non mostrati) ed esperimenti di infezione hanno evidenziato che tutte inibiscono la replicazione virale in modo simile alle forme full-length e tagCD38. Una analogia inibizione era anche ottenibile incubando la linea cellulare MT2 in presenza di una forma solubile di CD38 costituita dalla porzione extracellulare (EC) della molecola (CD38₄₅₋₃₀₀) (**Fig. 23**).

Questi dati dimostrano che la regione inibitoria di CD38 è localizzata nella regione membrano-prossimale, a livello degli aa 45-191.

A

B

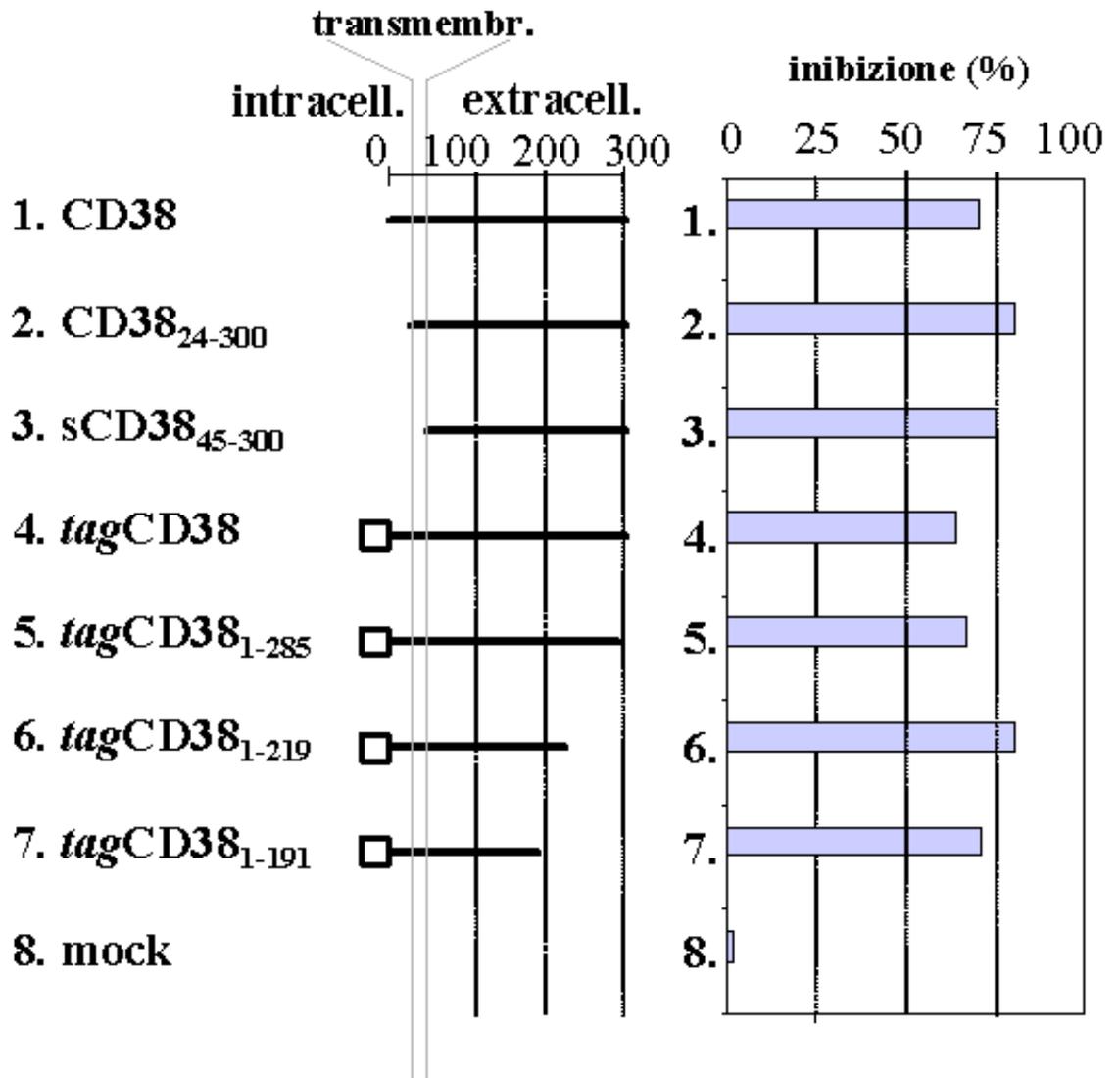


Fig. 23 A) Rappresentazione schematica di CD38 e delle molecole mutanti utilizzate. In alcuni casi è stato aggiunto un *myc-tag* alla porzione NH₂-terminale () per permettere il riconoscimento delle molecole trasfettate mediante un mAb disponibile commercialmente; B) Inibizione nella produzione di p24 nelle diverse linee. La linea MT2.M è stata utilizzata come controllo negativo, mentre la linea MT2.CD38tag è stata utilizzata per escludere che *myc-tag* potesse avere un effetto inibitorio *per se*.

5.4.3 Allineamento tra le sequenze di CD38 e di gp120 di HIV-1

Il passo successivo è stato mappare l'attività anti-HIV-1 di CD38 compresa tra gli aa 45-191.

L'analisi di sequenza di questo tratto della molecola ha evidenziato che la sequenza costituita dagli amminoacidi membrano-prossimali 45-74 di CD38 mostra somiglianze significative con una grossa porzione dell'ansa V3 di gp120 (sottotipo B). In particolare si osserva che la regione di omologia è incentrata su un'identità nella tripletta GPG (aa 52-54) altamente conservata all'apice dell'ansa V3 (**Fig. 24**), una regione fondamentale per gli effetti regolatori esercitati dall'ansa V3 durante il processo di attracco/fusione del virus [153].

```
CD38      45RWRQTWSGPGITTKRFPETVLARCVKYTEIH
           ...  GPG  ...
gp120    299NTRKSIIGPGR AFYTTGQIIIG---DIRQAH
```

Fig. 24 Allineamento tra la sequenza del CD38₄₅₋₇₄ con la sequenza consenso del sottotipo B di HIV-1 effettuata con il software LALIGN: identità locali (:) e somiglianze (.)

Abbiamo quindi valutato la specificità e la generalità di queste omologie allestendo un allineamento multiplo tra le sequenze CD38₄₅₋₇₄ e le sequenze consenso dell'ansa V3 dei principali sottotipi di HIV-1 appartenenti al gruppo M (A, B, C, D, and CRF_01

AE), ai gruppi N e O, SIV_cpz (filogeneticamente separato dal comune ancestrale dei gruppi di HIV-1) e di HIV-2. Utilizzando l’algoritmo di Morgenstern DIALIGN [154], abbiamo osservato che la maggior parte degli amminoacidi di CD38₄₅₋₇₄ mostravano un allineamento significativo con le sequenze lentivirali (**Fig. 25**). Utilizzando 1000 sequenze random, abbiamo calcolato un $p < 0.01$ per un allineamento uguale o più elevato rispetto a quello ottenuto confrontando CD38₄₅₋₇₄ e le sequenze del loop V3 appartenenti a diversi ceppi virali

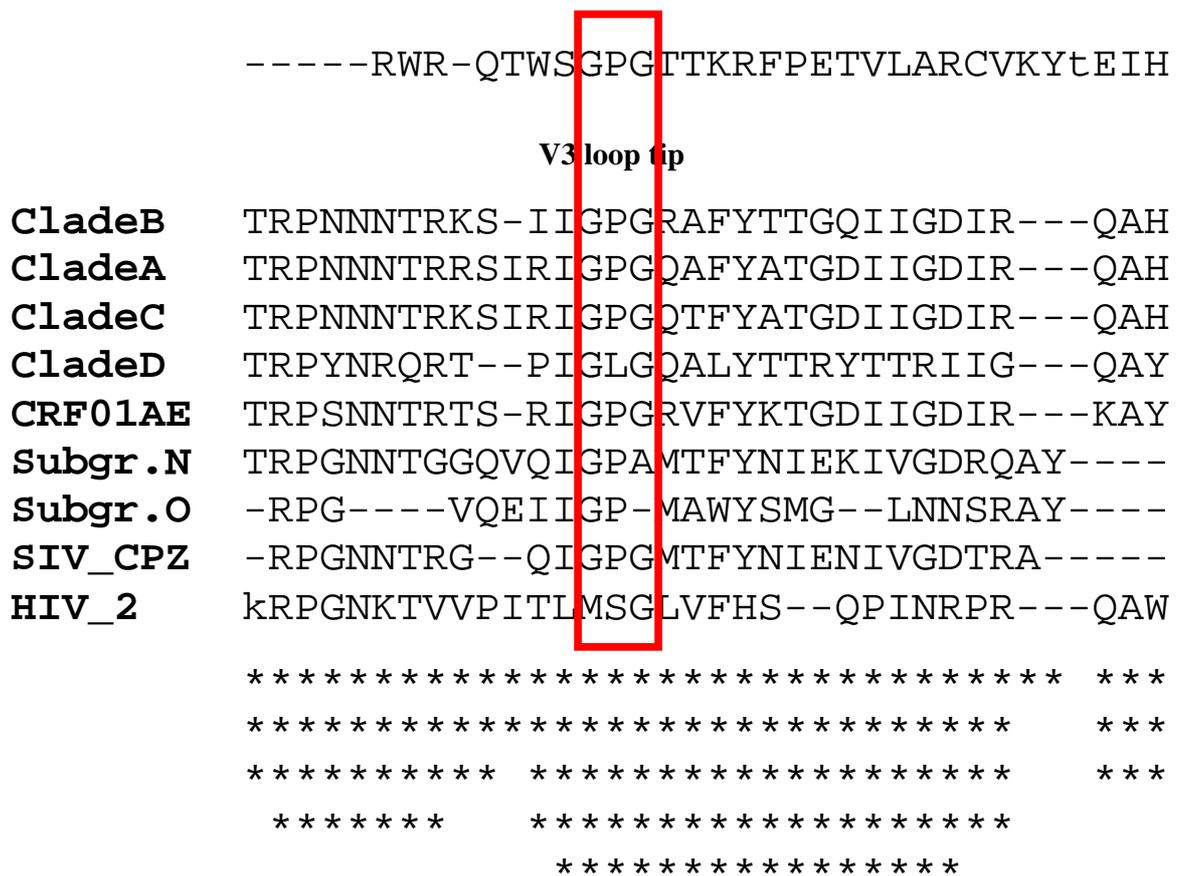


Fig. 25 Allineamento tra la sequenza CD38₄₅₋₇₄ con le sequenze consenso dei sottotipi A-E, dei gruppi N ed O, di SIV_CPZ di HIV-1 e di HIV-2, utilizzando l’algoritmo DIALIGN di Morgenstern utile per l’allineamento di sequenze multiple. La sequenza di CD38₄₅₋₇₄ è stata utilizzata come stampo per visualizzare le sue relazioni con sequenze di gp120 rappresentative delle diversità tra i lentivirus infettanti i primati. Il numero degli asterischi in figura riflette i gradi di somiglianza fra le diverse sequenze. L’area di maggior somiglianza è quella del *V3 loop tip*

5.4.4 Effetti dei peptidi sintetici derivati da CD38 sulla replicazione di HIV-1

Abbiamo quindi valutato se un peptide solubile (sCD38₅₁₋₇₄) comprendente la regione di omologia avesse la capacità di riprodurre gli effetti anti-HIV-1 mostrati dalla molecola intera. Abbiamo perciò sintetizzato un peptide costituito dagli aminoacidi ₅₁SGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIH₇₄ di CD38 (sCD38₅₁₋₇₄) comprendente la sequenza GPG.

La sequenza compresa tra gli aa 51-74 è stata scelta per escludere i triptofani 46 e 50, che avrebbero reso il peptide insolubile in acqua [155, 156].

Esperimenti pilota hanno mostrato che il peptide sCD38₅₁₋₇₄ inibiva l'infezione di HIV-1 in cellule MT4 (CD4⁺CXCR4⁺CD38⁻) in modo dose-dipendente, con una EC₅₀ di 2,2 μM (**Fig. 26**).

Inoltre sCD38₅₁₋₇₄ è stato in grado di inibire la formazione di sincizi nelle co-culture H9_{IIIB}/MT2 (**Fig. 27**) e di inibire il legame di gp120 alle cellule MT4 (**Fig. 28**).

Generalità e specificità di queste osservazioni sono state valutate paragonando gli effetti del peptide sCD38₅₁₋₇₄ su ceppi virali con diversa origine e tropismo. In questi casi abbiamo utilizzato una concentrazione di peptide (10μM), in grado di ridurre di oltre il 50% l'infezione da parte di HIV-1_{IIIB} sulle cellule MT4. In questi esperimenti abbiamo osservato che il peptide sCD38₅₁₋₇₄ inibiva ceppi di HIV-1 R5, X4 ed R5/X4 ed isolati primari di HIV-2, ma non inibiva uno pseudotipo di HIV-1 (pRRL.sin.hPGK.GFP) [157] esprime le proteine dell'*envelope* del virus della stomatite vescicolare (VSV) che infetta le cellule in modo CD4-indipendente (**Fig. 29**). Gli isolati primari X4 e X4/R5 e lo pseudotipo pRRL.sin.hPGK.GFP sono stati utilizzati per infettare le cellule MT4, mentre gli isolati primari R5 sono stati usati per infettare PBMC di sangue periferico (PBMC).

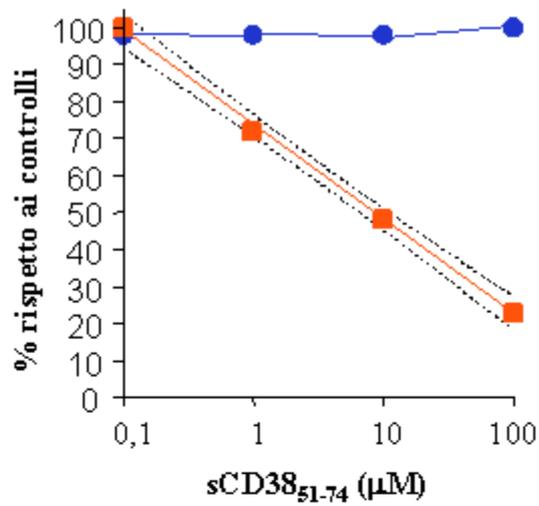


Fig. 26 Inibizione dose-dipendente da parte del peptide sCD38₅₁₋₇₄ sulla replicazione virale (dosata come quantità di p24 nei surnatanti di coltura) nelle cellule MT4 infettate con HIV-1_{IIB}. I quadrati rossi rappresentano le di p24, mentre i cerchi blu rappresentano la vitalità delle cellule rispetto alle cellule MT4 non infettate.

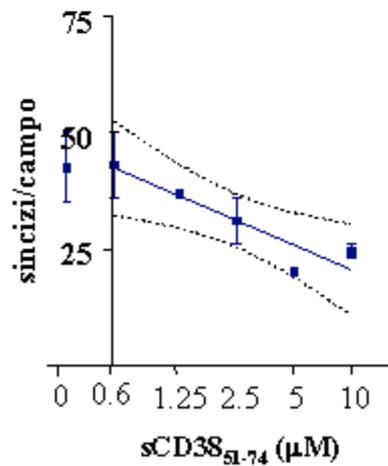


Fig. 27 Inibizione dose-dipendente della formazione dei sincizi nelle co-culture H9_{IIB}-MT2 da parte del peptide sCD38₅₁₋₇₄.

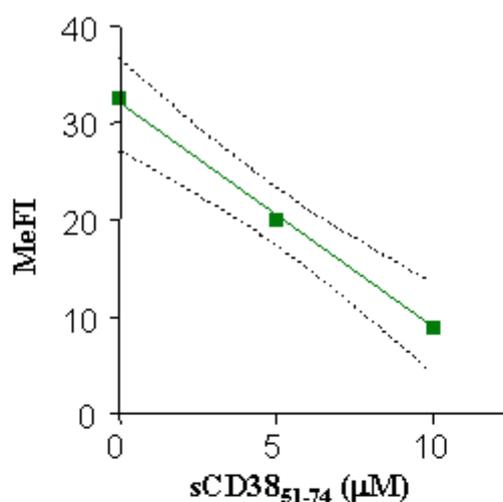


Fig. 28 Colorazione delle cellule MT4 con gp120-FITC in presenza di sCD38₅₁₋₇₄.

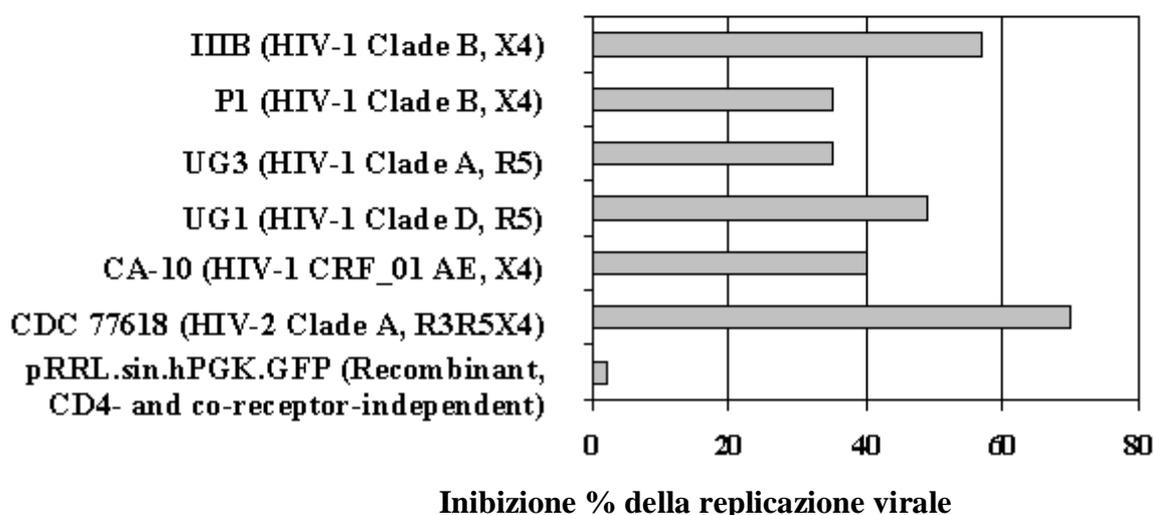


Fig. 29 Effetto del peptide sCD38₅₁₋₇₄ sulla replicazione di isolati primari appartenenti a diversi sottogruppi di HIV-1 e HIV-2 e sull'espressione di un pseudotipo di un vettore di HIV-1 che porta la glicoproteina dell'envelope del virus della stomatite vescicolare. Questi esperimenti sono stati effettuati sulla linea cellulare MT4 durante gli esperimenti di infezione con i ceppi virali X4 e X4/R5 e con lo pseudotipo pRRL.sin.hPGK.GFP, mentre cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) sono state infettate con isolati primari R5. In questi esperimenti abbiamo utilizzato il peptide sCD38₅₁₋₇₄ alla concentrazione 10µM. L'inibizione è stata calcolata sulla base dei livelli di p24 e p27 virali nel surnatante di coltura al quinto dall'infezione virale.

Possiamo quindi concludere che il peptide sCD38₅₁₋₇₄ inibisce l'infezione da HIV-1 agendo sul processo di fusione mediata di gp120.

Abbiamo quindi voluto appurare se il peptide sCD38₅₁₋₇₄ mantenesse la capacità propria di CD38 *full length* di inibire il legame di gp120 a CD4 in assenza di altre molecole della superficie cellulare, utilizzando piastre da ELISA su cui era stata preadsorbita una forma ricombinante solubile di CD4 (rshCD4) (2µg/ml). Queste piastre sono state incubate con diverse concentrazioni gp120_{IIIb} biotinilata, in presenza o assenza del peptide sCD38₅₁₋₇₄ (10µM); il legame di gp120 è stato quindi valutato utilizzando streptavidina marcata con perossidasi. Come si può osservare dalla **Fig. 30**, il peptide sCD38₅₁₋₇₄ inibisce il legame CD4/gp120, mentre la competizione con altri peptidi irrilevanti di controllo non ha mostrato nessuna inibizione.

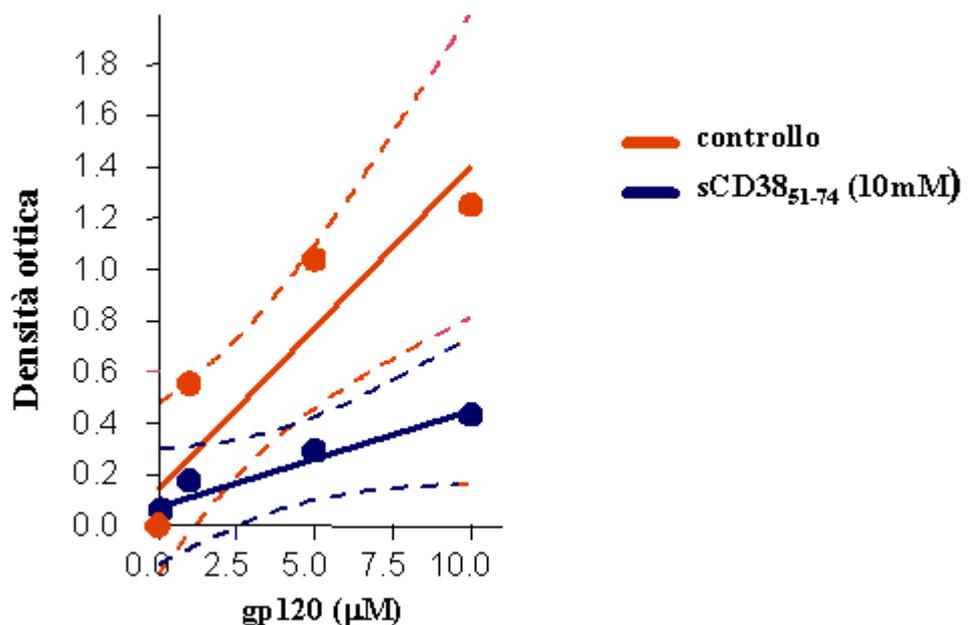


Fig. 30 Regolazione negativa del legame della gp120 al rshCD4 dovuta al peptide sCD38₅₁₋₇₄. Sull'asse delle X si trovano le concentrazioni di gp120 biotinilata incubate su piastre da ELISA con preadsorbito rshCD4. Sull'asse delle Y abbiamo invece la densità ottica (O.D.) letta a $\lambda=450$ nm, alla fine della reazione tra il substrato OPD e la streptavidina-HRP.

5.4.5 Effetto anti-HIV di una forma ramificata del peptide sCD38₅₁₋₇₄

Nel tentativo di aumentare l'attività antivirale del peptide sCD38₅₁₋₇₄, abbiamo prodotto un costrutto peptidico ramificato contenente otto sequenze 51-74 legate covalentemente ad un nucleo polilisinico (**Fig. 31**). La presenza di più siti attivi nella stessa molecola infatti dovrebbe aumentarne l'avidità di legame e permettere alla molecola di esercitare la sua azione a concentrazioni inferiori rispetto al peptide monovalente. Inoltre è stato proposto da più autori che peptidi multi-ramificati corti (*Multi Branched Peptides* - MBPs) assumano con maggiore probabilità la conformazione assunta nella molecola nativa intera [157-159].

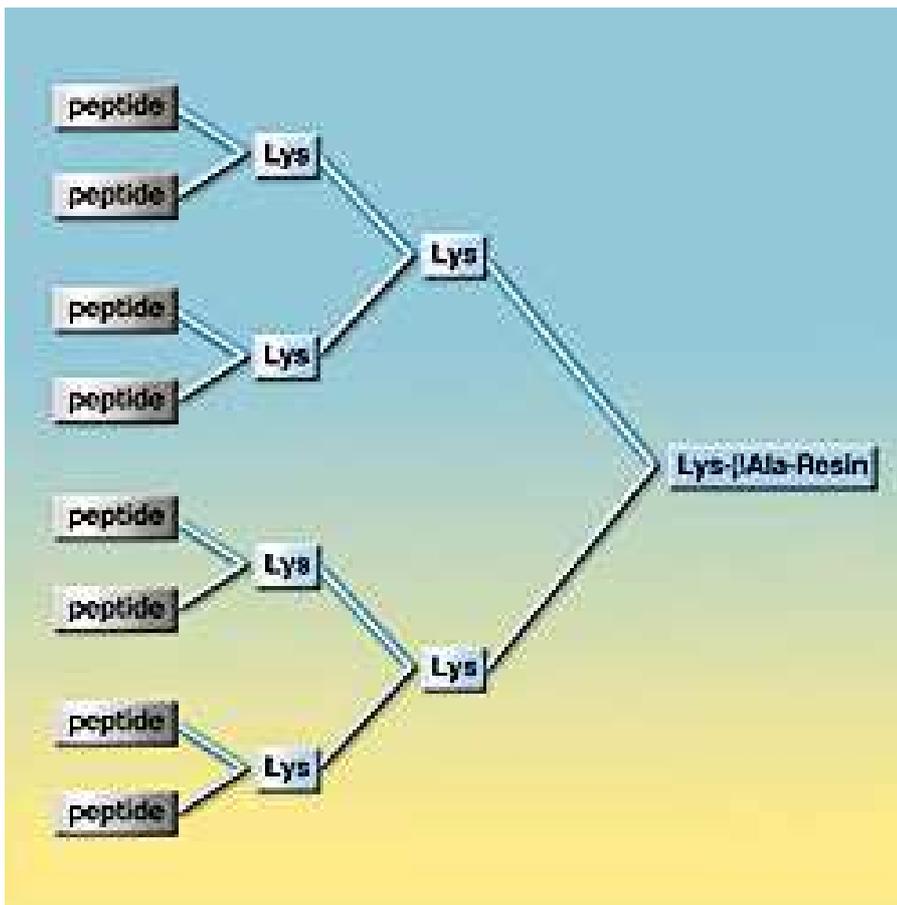


Fig. 31 Struttura di sCD38₅₁₋₇₄ MBP . La molecola è composta da otto sequenze 51-74 unite covalentemente ad un nucleo polilisinico.

Il peptide da noi utilizzato è stato denominato sCD38₅₁₋₇₄ MBP.

Abbiamo eseguito esperimenti di infezione con il ceppo di laboratorio HIV-1_{IIIB} sulla linea T linfocitaria MT-4, confrontando l'attività inibitoria del peptide monovalente lineare sCD38₅₁₋₇₄ e della sua variante multiramificata sCD38₅₁₋₇₄MBP. Questi esperimenti hanno dimostrato che sCD38₅₁₋₇₄ MBP inibisce l'infezione da parte di HIV-1_{IIIB} in una scala di concentrazione compresa tra 1 e 100 nanomolare ($EC_{50}=12$ nM) (**Fig. 32B**), ovvero concentrazioni circa 200 volte inferiori rispetto a quelle necessarie per ottenere gli stessi risultati con il peptide monovalente lineare ($EC_{50}=2.2$ μ M) (**Fig. 32A**).

Simili test di infezione sono quindi stati effettuati valutando l'effetto di sCD38₅₁₋₇₄MBP sull'infezione di linee primarie di PBMC da parte di HIV-1_{IIIB} e o di isolati primari di HIV. Questi esperimenti hanno dimostrato che CD38₅₁₋₇₄MBP inibisce l'infezione dei PBMC da parte di HIV-1_{IIIB} in modo dose-dipendente a concentrazioni ancora più basse di quelle richieste nella linea cellulare MT-4, e comprese tra 0.1-10 nM (**Fig. 32C**). La dose-dipendenza può essere descritta come una curva polinomiale di secondo ordine mostrata in figura ($R^2=0.998$, regressione non lineare). In **Fig. 32D** è mostrata la cinetica di crescita di due isolati primari virali (R5) non correlati filogeneticamente tra loro, appartenenti al sottotipo C (HIV-1_{VI 829}) e al sottotipo A (HIV-1_{UG3}) [160], in PBMC infettati in presenza o in assenza di 1 nM di sCD38₅₁₋₇₄MBP, che rappresenta la più bassa concentrazione nel plateau della curva dose-risposta mostrata in **Fig. 32C**. I risultati utilizzando HIV-1_{UG3} sono stati ottenuti attraverso l'inoculo di cellule a una molteplicità di infezione (MOI) di 0.5 ed hanno dimostrato che sCD38₅₁₋₇₄MBP mantiene l'attività anti-HIV-1 anche contro concentrazioni virali più elevate di quelle utilizzate normalmente nei nostri esperimenti (MOI=0.1).

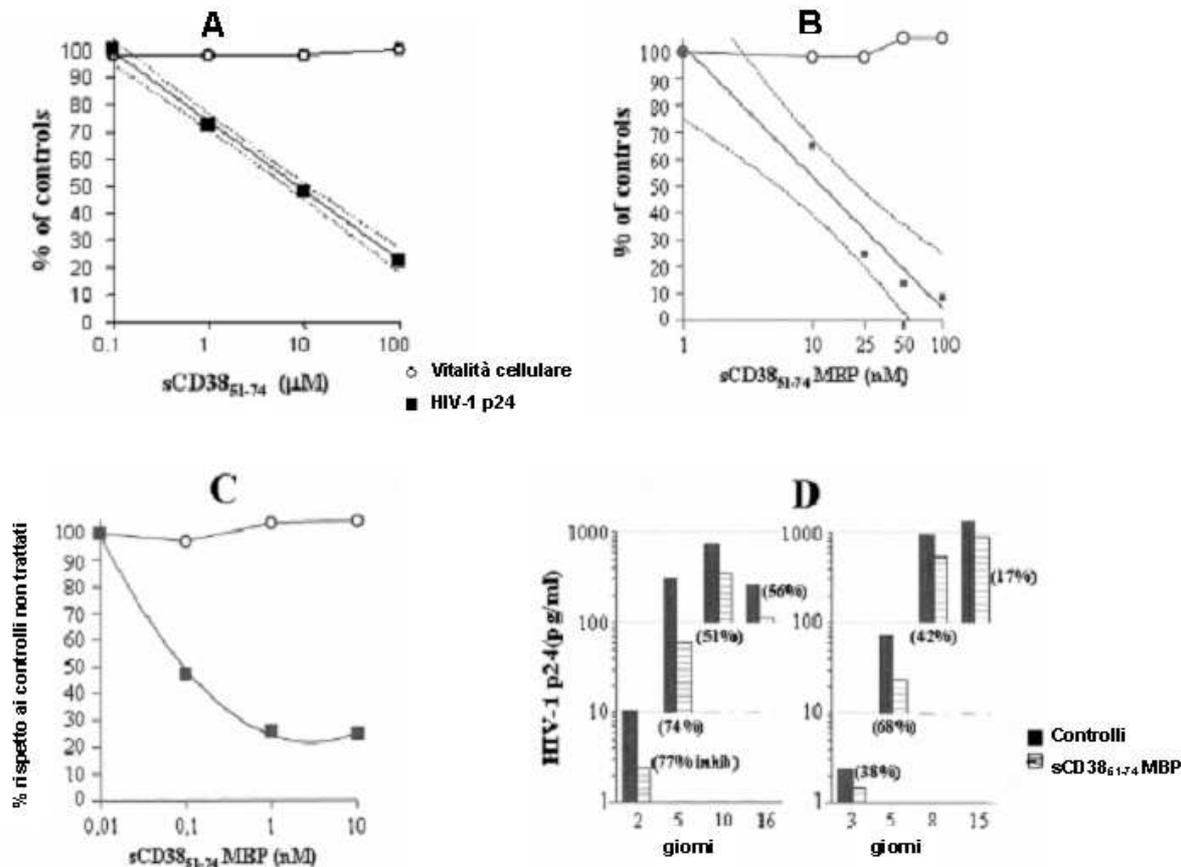


Fig. 32 Effetti di sCD38₅₁₋₇₄ MBP sulla replicazione virale. Inibizione dose-dipendente dell'infezione di cellule MT-4 con il ceppo virale HIV-1_{IIIB} mediata da sCD38₅₁₋₇₄ (A) e da sCD38₅₁₋₇₄ MBP (B). Linee piene: linee di regressione lineare che meglio interpolano i punti che corrispondono ad una mediana dei valori ottenuti da tre esperimenti indipendenti; linee tratteggiate: linee corrispondenti al limite di confidenza al 95% delle rette di regressione ($p < 0.01$, test t utilizzato per calcolare la pendenza). Quadrati neri: produzione di p24; cerchi bianchi: vitalità di cellule MT-4 non infettate dimostrata con il saggio MTT. C) Inibizione dose-dipendente dell'infezione di PBMC con un isolato primario R5 (HIV-1_{VI 829}) mediata da sCD38₅₁₋₇₄ MBP. Quadrati neri: produzione di p24; cerchi bianchi: vitalità dei PBMC non infettati dimostrata con il saggio MTT. D) Cinetica di crescita di due isolati primari (R5) in PBMC infettati in presenza (barre chiare) o in assenza (barre scure) di 1 nM di sCD38₅₁₋₇₄ MBP.

5.4.6 *Coinvolgimento del dominio GPGTTK negli effetti anti-HIV-1 di CD38 ed interazione gp120/CD4*

Negli allineamenti mostrati nella **Fig. 25**, l'esamero GPGTTK (amminoacidi 52-57 di CD38) corrisponde all'apice del loop V3 di gp120, che gioca un ruolo fondamentale durante il processo di infezione. Abbiamo analizzato quindi il ruolo di questa sequenza di CD38 nell'attività anti-HIV- utilizzando 2 peptidi: 1) un costrutto MBP nel quale 8 sequenze GPGTTK sono covalentemente legate ad un core di polilisina (sCD38₅₂₋₅₇MBP) e 2) un peptide sCD38₅₁₋₇₄ modificato nel quale gli aa 51-57 del CD38 sono stati sostituiti con una sequenza random (TSHALSA) che mantiene la stessa carica totale (sCD38₅₈₋₇₄). I risultati ottenuti ci hanno permesso di osservare che il peptide sCD38₅₂₋₅₇MBP (**Fig. 33**), ma non quello sCD38₅₈₋₇₄ (dati non mostrati), era in grado di inibire l'infezione di HIV-1_{IIB} nelle cellule MT4 in modo dose-dipendente, in modo simile al peptide sCD38₅₁₋₇₄ (EC₅₀= 4,4µM).

Infine, abbiamo valutato il ruolo della sequenza GPGTTK nella molecola di CD38 intera. A questo scopo abbiamo trasfettato con una forma mutante di CD38 mancante degli aminoacidi GPGTTK (MT2.CD38_{Δ52-57}) la linea cellulare MT2. CD38_{Δ52-57} mantiene sulla superficie cellulare la stessa struttura conformazionale del CD38 full-length, come evidenziato dal suo riconoscimento da parte dell'anticorpo α-CD38 IB4 e dal mantenimento dell'attività ribosiliclasica della molecola (dati non mostrati).

Al contrario, esperimenti di FRET e di infezione hanno mostrato che questa molecola non dà associazione laterale con CD4 sulla superficie cellulare (**Fig. 34**) e che non mantiene l'attività inibitoria sull'infezione mostrata dal CD38 wild type (**Fig. 35**). Questi effetti non sono dovuti a differenze nell'espressione di CD38, CD4 o CXCR-4, che erano simili nelle linee cellulari utilizzate [MT2.CD38 e MT2.CD38_{Δ52-57} (dati non mostrati)].

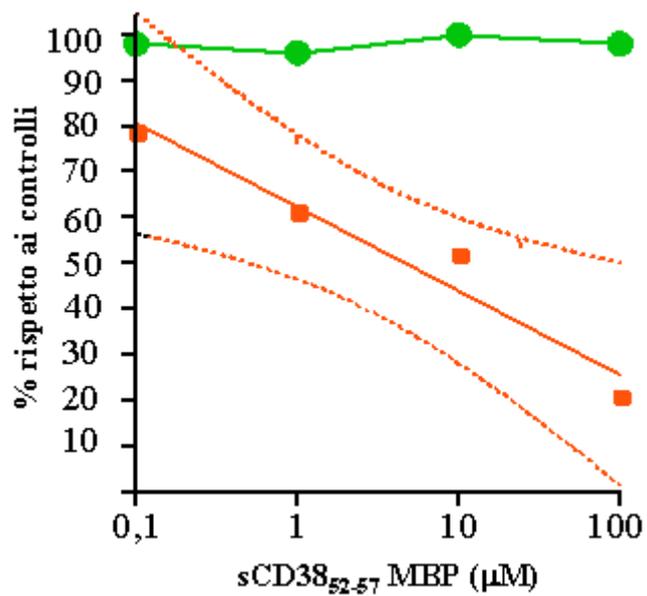


Fig. 33 Inibizione dell'infezione da HIV-1_{IIIB} sulle cellule MT4 da parte del peptide sCD38₅₂₋₅₇MBP. I quadrati () rappresentano la produzione di p24, mentre i cerchi () rappresentano la vitalità cellulare delle cellule MT4 non infettate, ma incubate con il peptide.

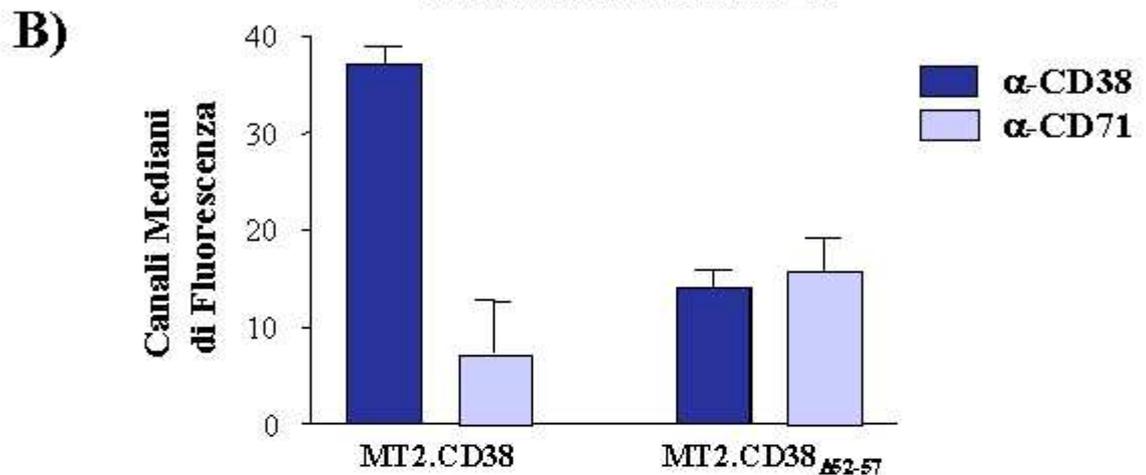
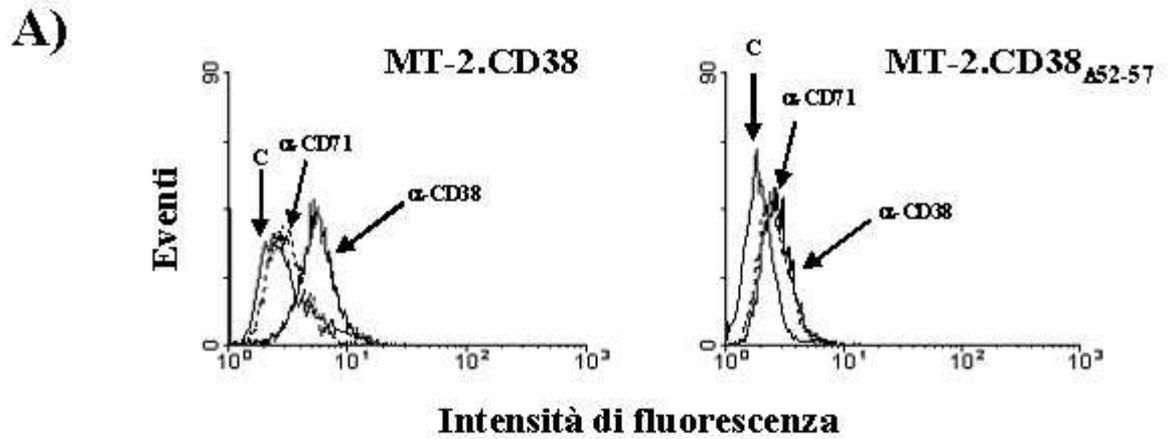


Fig. 34 **A)** FRET tra CD4 e CD38 nelle cellule MT2.CD38 e MT2.CD38_{Δ52-57}. Le cellule sono state marcate con l'mAb anti-CD4 coniugato con il fluorocromo Cy3 e con gli mAbs anti-CD38 e anti-CD71 FITC. Uno spostamento della curva verso destra indica FRET. **B)** Il grafico a barre mostra la media \pm SD dei canali mediani di fluorescenza proveniente da tre diversi esperimenti. Il CD4 fa FRET con CD38, ma non con CD38_{Δ52-57} o con CD71.

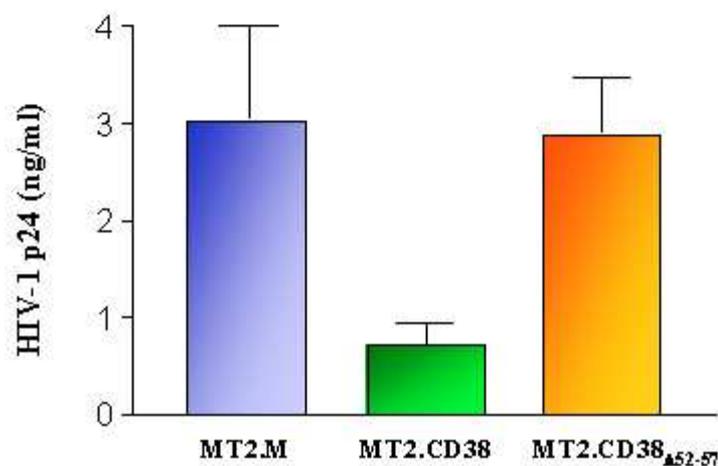


Fig. 35 Valori della p24 nei surnatanti di coltura delle cellule MT2.M, MT2.CD38 e MT2.CD38_{Δ52-57} al 5° giorno dopo l'infezione con HIV-1_{IIIB}. La replicazione di HIV-1 è simile nelle cellule MT2.M e nelle cellule MT2.CD38_{Δ52-57}, mentre è molto più alta rispetto alle cellule MT2.CD38.

5.4.7 Valutazione della tossicità di sCD38₅₁₋₇₄MBP

Il peptide sCD38₅₁₋₇₄MBP potrebbe in teoria essere utilizzato come microbicide locale. Per questo motivo ci siamo quindi chiesti se il peptide presentasse una tossicità cellulare che ne avrebbe escluso a priori l'utilizzo. Infatti, i farmaci candidati ad essere microbicidi locali non devono produrre tossicità cellulare, che potrebbe causare un danno dell'epitelio in grado di favorire la penetrazione del virus nell'organismo. Abbiamo valutato l'eventuale tossicità di sCD38₅₁₋₇₄MBP nei confronti delle linee cellulari MT-4, HeLa e di PBMC quiescenti. I diversi tipi cellulari sono stati incubati a 37°C per 36 ore in presenza o assenza di dosi crescenti di sCD38₅₁₋₇₄MBP. Per ogni condizione di coltura sono state valutate la vitalità cellulare e l'apoptosi rispettivamente con il saggio del metil-tetrazolio (MTT) e con la colorazione tramite Ioduro di Propidio (PI) e Annexina V coniugata con fluoresceina isotiocianato (FITC), (**Fig. 36**). Questi esperimenti hanno dimostrato che sCD38₅₁₋₇₄MBP, non altera la vitalità cellulare, e non induce apoptosi a nessuna delle concentrazioni valutate (range: 0.1-100 nM).

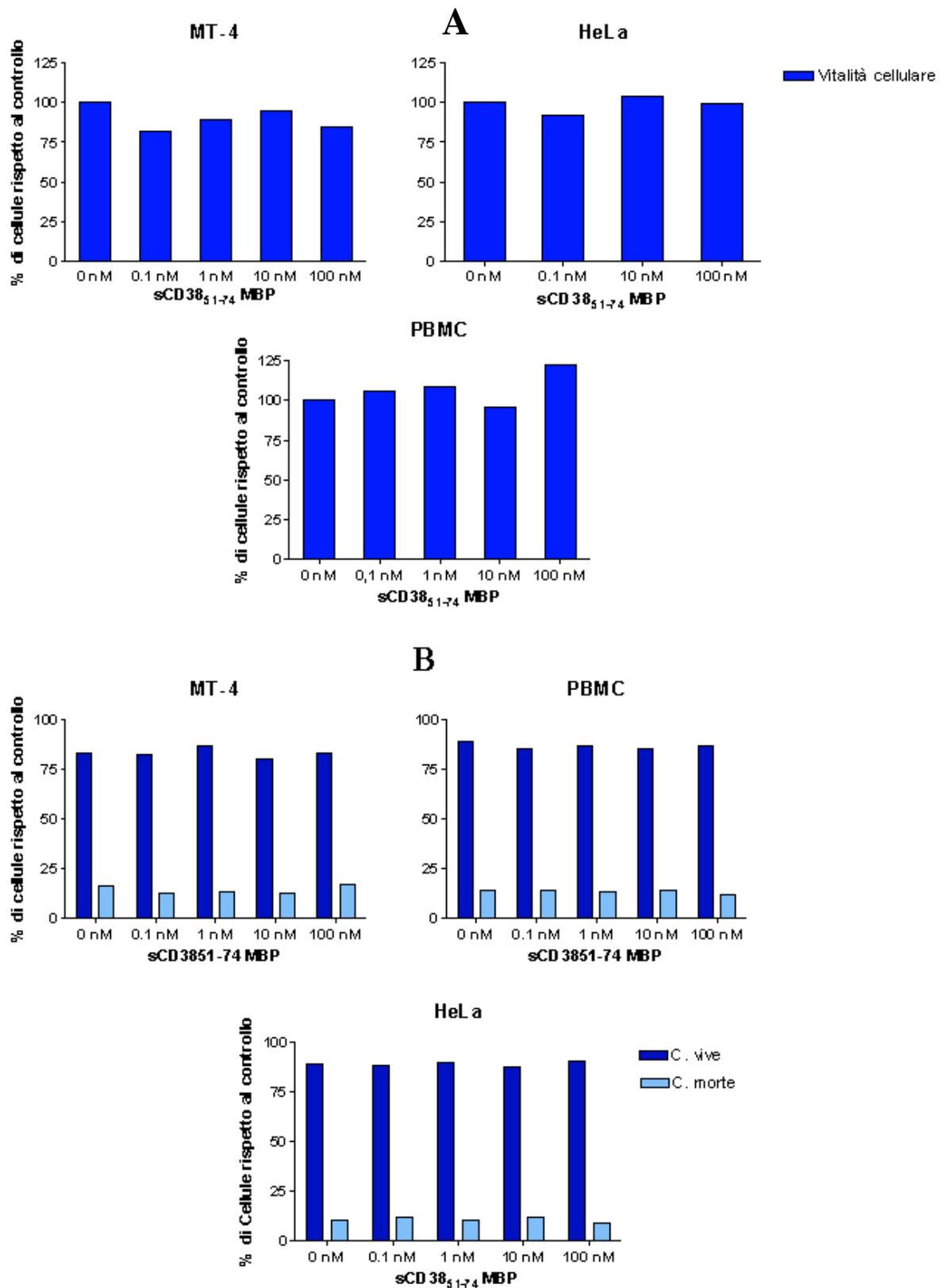


Fig. 36 Vitalità di linee cellulari trattate con sCD38₅₁₋₇₄ MBP. Le linee cellulari MT-4, HeLa e PBMC sono state trattate con diverse concentrazioni di sCD38₅₁₋₇₄MBP e la vitalità è stata espressa come percentuale rispetto al controllo non trattato. In (A) la vitalità è stata valutata con il metodo del metil-tetrazolio (MTT); in (B) con il metodo del Propidio Ioduro (PI) Annessina V FITC; come si può notare sCD38₅₁₋₇₄ MBP non sembra influenzare la vitalità cellulare. In figura sono riportati i dati di un esperimento rappresentativo di tre.

5.4.8 Valutazione dell'attivazione linfo/monocitaria indotta da sCD38₅₁₋₇₄ MBP sui PBMC

I farmaci candidati ad essere microbicidi locali non devono indurre infiammazione, che potrebbe favorire la penetrazione di HIV attraverso le mucose, oppure attivazione dei linfociti, che potrebbe favorire il loro reclutamento nella mucosa e la loro infezione [162]. Per questo motivo abbiamo testato se il peptide sCD38₅₁₋₇₄ MBP potesse indurre l'attivazione di PBMC, valutata come proliferazione, espressione di marcatori di attivazione sulla membrana e come produzione di citochine.

a) Espressione di marcatori di attivazione in PBMC quiescenti

In prima analisi abbiamo valutato se il peptide sCD38₅₁₋₇₄MBP fosse in grado di indurre l'espressione di marcatori di attivazione sui PBMC analizzando l'espressione di CD25 e CD95 (marcatori di attivazione linfocitaria) e di CD38 (marcatore di attivazione linfo-monocitaria).

PBMC quiescenti sono stati incubati in presenza o assenza del peptide (0, 0.1, 1, 10 e 100 nM) per 36 h e l'espressione delle molecole citate è stata quindi valutata su cellule CD4⁺ e CD4⁻ e su cellule CD3⁺ e CD3⁻, mediante doppia immunofluorescenza e citofluorimetria. Come mostrato in **Fig. 37** quest'analisi ha dimostrato che il peptide sCD38₅₁₋₇₄MBP non induce espressione di marcatori di attivazione linfocitaria a nessuna delle concentrazioni analizzate.

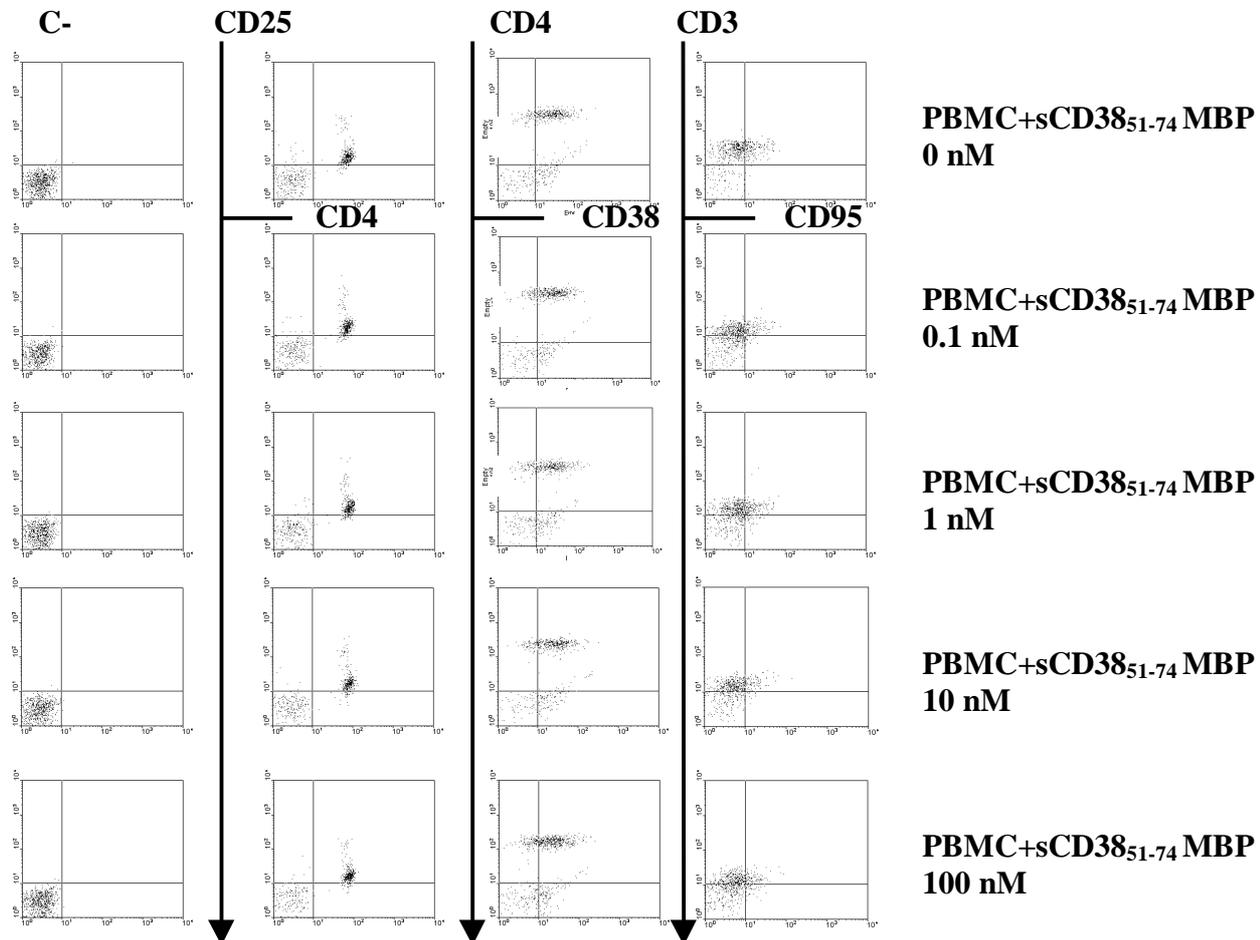


Fig 37. Espressione dei markers di attivazione cellulare CD38, CD95, CD25. Come si può osservare, non vi è variazione nella loro espressione durante il trattamento con crescenti concentrazioni di peptide CD38₅₁₋₇₄ MBP (range: 0.1-100 nM).

b) Induzione dell'espressione di citochine

In seconda analisi abbiamo valutato se sCD38₅₁₋₇₄MBP attivasse la proliferazione e la secrezione di citochine da parte di PBMC quiescenti o modulasse la secrezione di citochine da parte di PBMC attivati con mitogeni. PBMC quiescenti o attivati con PHA (0.1 e 1 µg/ml) sono stati incubati in assenza o presenza di sCD38₅₁₋₇₄MBP (1 e 10 nM) aggiunto al momento iniziale della coltura. I surnatanti di coltura sono quindi stati raccolti a dopo 36 h, e sono stati utilizzati per il dosaggio delle citochine. TNFα e le β-chemochine CCL3 e CCL4 sono stati utilizzati come marcatori di infiammazione acuta; IL2 e IFNγ come marcatori di risposte T helper di tipo 1 e di infiammazione cronica; IL4, IL5 e IL10 come marcatori di risposte T helper di tipo 2. CCL3 e CCL4 sono state valutate per mezzo di un test ELISA, mentre TNF-α, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN-γ mediante un multitest citofluorimetrico (cytometric bead assay kit) (**Fig. 38**). I grafici mostrano che il peptide sCD38₅₁₋₇₄MBP non induce la produzione di nessuna di queste citochine in PBMC quiescenti e non ne modula la produzione in PBMC attivati con PHA.

Abbiamo infine valutato se sCD38₅₁₋₇₄MBP influenzasse la proliferazione di PBMC attivati con concentrazioni ottimali dell'anticorpo monoclonale anti-CD3 (OKT3) in presenza o assenza di dosi crescenti di MBP. Il saggio di proliferazione usato si basa sull'incorporazione di ³H-T, espressa in c.p.m. (conte per minuto), durante le ultime 6 ore di 72 di coltura. Il risultato rappresentato in **Fig. 39** dimostra che sCD38₅₁₋₇₄MBP non ha nessun effetto sulla proliferazione dei PBMC a nessuna delle concentrazioni valutate (range: 0.1-100 nM).

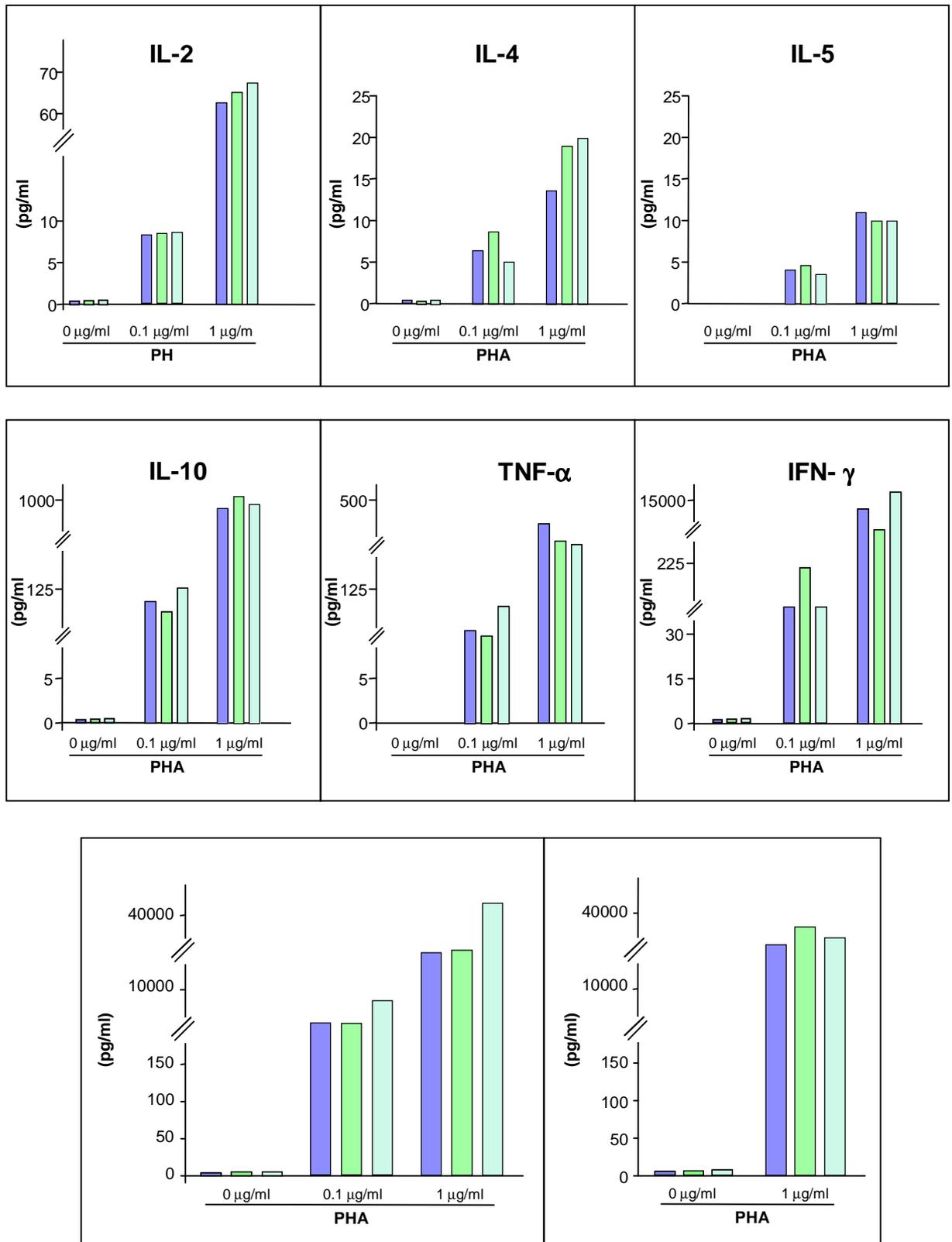


Fig. 38. Espressione citochinica di PBMC quiescenti (0 μg/ml PHA) e attivati (0.1 e 1 μg/ml PHA) trattati con diverse concentrazioni di sCD38₅₁₋₇₄MBP (0nM; 1nM; 10nM). I PBMC sono stati coltivati per 36h in presenza o assenza di sCD38₅₁₋₇₄MBP, sui surnatanti di coltura sono state dosate le citochine IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF-α e IFN-γ (mediante il kit multiplo di valutazione delle citochine) e le chemochine CCL3 e CCL4 (mediante ELISA). sCD38₅₁₋₇₄MBP non sembra influenzare la produzione citochinica da parte di PBMC quiescenti. In figura sono riportati i dati di un esperimento rappresentativo di quattro.

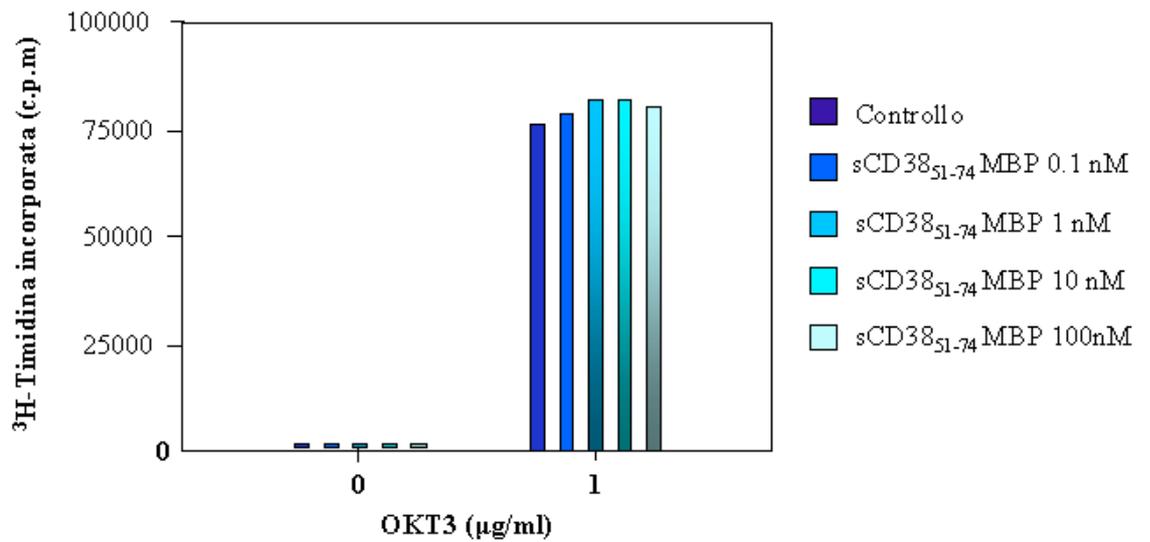


Fig. 39 Proliferazione di PBMC in presenza di sCD38₅₁₋₇₄ MBP. I PBMC sono stati stimolati con anti-CD3 1µg/ml (OKT3) in presenza o assenza di dosi crescenti di MBP. L'incorporazione di ³H-TdR durante le ultime 6 ore di 72 ore di coltura è espressa in c.p.m. (conte per minuto). In ogni condizione valutata sCD38₅₁₋₇₄MBP non si dimostra capace di influenzare la proliferazione linfo/monocitaria.

5.4.9 Valutazione della attività spermicida di sCD38₅₁₋₇₄MBP

La valutazione dell'attività spermicida è utile per un farmaco che si candidi come microbicide topico ad uso vaginale. Per questo motivo abbiamo valutato l'effetto di sCD38₅₁₋₇₄MBP sulla vitalità e motilità di spermatozoi umani. Campioni di sperma, appartenenti ad individui sani e da pazienti astenospermici, sono stati ottenuti dal Centro di Fertilità della Divisione di Ginecologia dell'Ospedale Maggiore della Carità di Novara. Essi sono stati incubati con il peptide sCD38₅₁₋₇₄MBP alla concentrazione di 10 nM a 37°C per 30 minuti e ne è stata quindi valutata la vitalità tramite il metodo di esclusione dell'Eosina-Negrosina e la motilità mediante analisi al MO in contrasto di fase. I risultati riassunti in **Tab. 6** indicano che il trattamento con il peptide non influenza né la vitalità né la motilità degli spermatozoi sia nei campioni provenienti da soggetti normali sia in quelli provenienti da soggetti astenospermici, il che indica l'assenza di effetto anche su spermatozoi ipo-funzionali. Possiamo quindi concludere che il peptide sCD38₅₁₋₇₄MBP non possiede alcuna attività spermicida.

n° campione	cells/ml	trattamento con sCD38 ₅₁₋₇₄ MBP (10 nM)	vitalità (%)	motilità (%)
1	60x10 ⁶	-	85	75
		+	85	75
2	70x10 ⁶	-	93	73
		+	93	73
3	110x10 ⁶	-	90	78
		+	91	77,5
4	90x10 ⁶	-	91	80
		+	91	80
5	60x10 ⁶	-	88	77
		+	88	76,5
6	95x10 ⁶	-	87,5	80
		+	88	80
7	70x10 ⁶	-	84	88
		+	84	88
8	80x10 ⁶	-	84	90
		+	84	90.5
9*	48x10 ⁶	-	80	55
		+	80.5	55
10*	40x10 ⁶	-	78	48
		+	78	48
11*	35x10 ⁶	-	75	50
		+	75,5	50
12*	30x10 ⁶	-	77	46
		+	77	46
Valori Normali	>20x10⁶	/	>75	>60

Tab. 6: Spermogramma relativo al trattamento degli spermatozoi dei donatori sani e dei pazienti con il peptide sCD38₅₁₋₇₄ MBP rispetto ai controlli. I risultati riportati in tabella indicano che il trattamento con il peptide CD38₅₁₋₇₄MBP (10nM) non influenza né la vitalità né la motilità degli spermatozoi sia nei campioni provenienti da soggetti normali sia da soggetti astenospermici. Ciò indica l'assenza di un effetto anche su spermatozoi ipo-funzionali (*).

5.5 *Discussione*

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che CD38 inibisce la replicazione di HIV-1 negli stadi precoci dell'infezione attraverso una sequenza compresa tra gli aa 52-57 nella regione membrano-prossimale della sua porzione EC e che la sua capacità inibitoria correla con la sua capacità di associarsi lateralmente con CD4.

La regione membrano-prossimale della porzione EC mostra significative somiglianze con l'ansa V3 della gp120 virale. Entrambe le regioni sembrano essere coinvolte nell'infezione da parte di HIV-1. Infatti, 1) sia CD38 sia l'ansa V3 di gp120 inibiscono la fusione di HIV-1 [158, 162]; 2) quest'effetto coinvolge peptidi omologhi nelle due molecole e viene perso quando questi peptidi vengono privati degli amminoacidi omologhi tra le due sequenze.

L'ansa V3 sembra essere coinvolta in varie interazioni secondarie che la gp120 stabilisce con varie molecole espresse sulla membrana cellulare [158-172]. In particolare sembra poter interagire:

- a) con i recettori chemochinici che funzionano da corecettori per il virus [168-170],
- b) con glicosfingolipidi di membrana, anch'essi chiamati in causa come recettori per il virus [171, 172],
- c) con lo stesso CD4, in una regione diversa rispetto alla regione di interazione principale tra CD4 e gp120 .

Sembra improbabile che CD38 agisca sulle prime due interazioni, in quanto è stato osservato in precedenza che CD38 inibisce l'adesione di gp120 a CD4 anche in sistemi acellulari, privi di recettori chemochinici o di glicosfingolipidi [168].

Quest'osservazione limita l'azione inibitoria di CD38 ad una interferenza diretta nella interazione tra gp120 e CD4. E' stato proposto che quest'interazione sia piuttosto complessa e cominci con lo stabilirsi di un legame principale tra il sito primario di

gp120 e il dominio D1 di CD4; quest'interazione principale sarebbe poi stabilizzata da una interazione secondaria tra l'ansa V3 di gp120 e un sito diverso di CD4 sempre situato su D1 [173-179]. Si può quindi ipotizzare che CD38 possa competere, attraverso la sequenza GPGTTK, con questa interazione secondaria di gp120. La distanza fra il dominio D1 membrano-distale di CD4 e la porzione membrano-prossimale del CD38 sembra complicare l'applicazione di questo modello. Si può però ipotizzare che questa distanza possa essere ridotta da due fattori: 1) è stato proposto che CD4 possa essere orientato obliquamente rispetto alla superficie cellulare, e 2) è stato proposto che la giunzione D2-D3 conferisca una certa flessibilità conformazionale al CD4 stesso [180], che sembra ripiegarsi in seguito al legame di gp120 in modo da permettere a gp120 stessa di avvicinarsi ai CCRs [182-184] (**Fig. 40**). La possibilità che questo ripiegamento possa anche favorire l'interazione di CD4 con CD38 è in accordo con la nostra osservazione che gp120 potenzia l'associazione laterale tra CD4 e CD38.

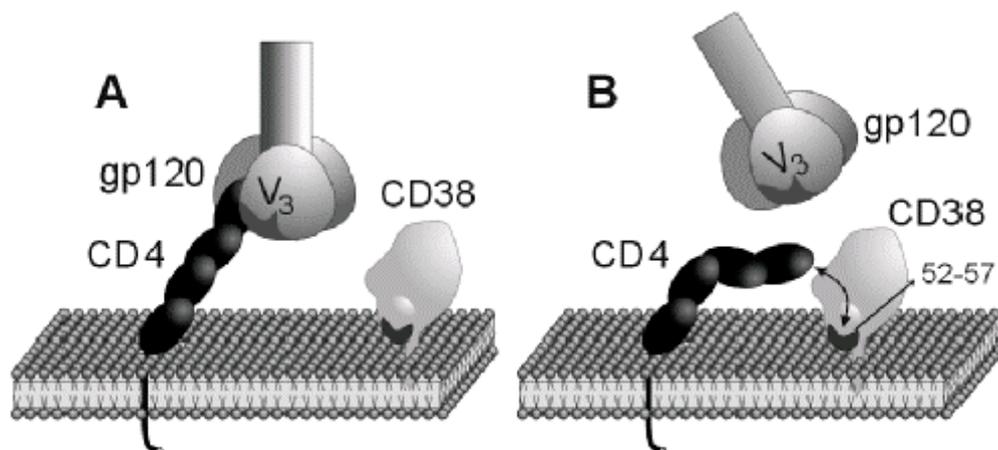


Fig. 40 Schema di un'ipotetica interazione tra gp120, CD4 e CD38. A) CD4 lega gp120; sebbene il ruolo della V3 loop in questa interazione sia ancora controverso, esso è in grado di stabilizzare il legame gp120/CD4. B) Il legame gp120/CD4 è down-modulato dalla presenza di CD38, che presenta associazione laterale con CD4. La sequenza 52-57 del CD38 sembra essere coinvolta nel promuovere gli effetti anti-HIV della molecola, così come l'associazione laterale tra le due molecole. Dato che la sequenza 52-57 di CD38 è omologa a un'altra presente all'apice della V3 loop di gp120, possiamo ipotizzare che essa riduca in parte l'affinità del legame tra gp120 e CD4.

Gli effetti di CD38 sulla replicazione di HIV-1 potrebbero aiutare a capire alcuni aspetti dell'interazione virus/ospite. Ad esempio è stato recentemente suggerito che HIV-1 infetti preferenzialmente cellule CD38⁻ e che gli alti livelli di espressione dei geni di HIV-1 mostrate dalle cellule T attivate (che sono CD38⁺) siano dovuti eventi successivi all'ingresso del virus [161, 187]. Si può proporre che, nei linfociti attivati, un'alta espressione di CD38 potrebbe favorire gli stadi tardivi della replicazione di HIV-1, in modo simile alla regolazione negativa di CD4 indotta dall'HIV stesso, cioè limitando la superinfezione da parte di altre particelle virali e/o favorendo il distacco di particelle virali appena prodotte.

La regolazione negativa della fusione di HIV-1 mediata da CD38 merita attenzioni anche dal punto di vista delle prospettive cliniche. Gli studi sull'attività anti-retrovirale di peptidi solubili derivati da CD38 mostrati in questo lavoro hanno permesso di comprendere meglio la specificità di questi derivati proteici e pongono le basi per ulteriori studi volti alla progettazione di farmaci per lo sviluppo di "microbicidi topici". Con questa espressione si intende un agente in grado di distruggere i virioni oppure di inibirne l'ancoraggio alle cellule-bersaglio a livello della mucosa genitale. La disponibilità di efficaci microbicidi topici potrebbe, infatti, rappresentare un'arma molto utile per l'autotutela delle donne in molti paesi in cui, per ragioni culturali, si rifiuta l'uso del preservativo. Un farmaco di questo tipo potrebbe limitare la trasmissione del virus in rapporti sessuali non protetti e intensificare la sicurezza di quelli protetti.

E' su questa linea che sono stati condotti gli esperimenti descritti in questa tesi volti a costruire un peptide derivato da CD38 che possa essere utilizzato come base di partenza per la costruzione di un microbicida locale. Questi esperimenti hanno permesso di caratterizzare l'attività del peptide multiramificato sCD38₅₁₋₇₄MBP il

quale sviluppa un'efficace azione anti-HIV in vitro a concentrazioni nanomolari, compatibili con un uso locale in vivo, in assenza di evidenti effetti tossici o proinfiammatori.

L'efficacia di sCD38₅₁₋₇₄MBP è stata inizialmente valutata sulla infezione della linea continua MT-4 da parte del ceppo virale di laboratorio HIV-1_{IIIB} in quanto questo rappresenta un sistema estremamente standardizzato che permette una grande riproducibilità del dato e rappresenta uno dei classici sistemi di screening per potenziali inibitori dell'infezione da HIV-1. Il risultato è stato successivamente confermato utilizzando un sistema sperimentale più complesso, ma più vicino alla infezione naturale in vivo, rappresentato dall'infezione di PBMC attivati da parte di isolati primari del virus. La maggior complessità, ma anche la maggiore informatività, di questo sistema è legata alla variabilità sia dei donatori sia degli isolati virali che determinano una conseguente potenziale maggiore variabilità del risultato sperimentale.

I risultati di questi esperimenti di infezione hanno dimostrato che sCD38₅₁₋₇₄MBP inibisce in modo efficace e specifico l'infezione sia della linea cellulare MT-4 sia, e in modo ancor più evidente, dei PBMC. Nei nostri esperimenti la massima efficacia è stata raggiunta nell'infezione dei PBMC da parte dell'isolato primario HIV-1_{UG3}; in questo sistema sperimentale la replicazione virale è risultata inibita del 74% utilizzando una concentrazione di sCD38₅₁₋₇₄MBP pari ad appena 1 nM. È degno di nota il fatto che l'inibizione è osservabile anche utilizzando cariche virali molto elevate, ovvero anche 5 volte superiori rispetto a quelle usate abitualmente in questi esperimenti di infezione (MOI 0.5 anziché 0.1).

Queste osservazioni portano a concludere che il peptide sCD38₅₁₋₇₄MBP sia in grado di inibire in maniera altamente efficace e specifica l'infezione da HIV e che possa

essere un buon punto di partenza per la progettazione di un “microbicide topico” efficace nel limitare la trasmissione sessuale da HIV.

Da questo punto di vista, ulteriori aspetti positivi di sCD38₅₁₋₇₄MBP sono l’assenza di una sua evidente tossicità cellulare o attività proinfiammatoria, le quali potrebbero danneggiare la mucosa e favorire l’infezione. L’interesse del peptide è ulteriormente aumentato dalla sua natura di peptide autologo, che dovrebbe escluderne l’immunogenicità per l’uomo. Questo dovrebbe limitare notevolmente il rischio di risposte immuni anti-peptide, che potrebbero da un lato ridurre l’efficacia nelle successive somministrazioni, e dall’altro causare l’insorgere di indesiderati processi infiammatori che potrebbero favorire l’infezione nei soggetti sensibilizzati. L’esclusione di questo ultimo fattore è un dato importante anche perché una risposta immunitaria locale specifica potrebbe determinare lo sviluppo di un infiltrato cellulare ricco di linfociti CD4⁺ e di macrofagi che sarebbe particolarmente suscettibile all’infezione.

Se la possibilità di sfruttare la sequenza amminoacidica GPGTTK di CD38 per lo sviluppo di microbicidi topici che la utilizzino da sola o in associazione con altri farmaci appare di per sé attraente, ancora più interessante sarebbe l’impiego del peptide come farmaco sistemico capace di inibire la fusione del virus con la cellula. Un farmaco di questo tipo potrebbe essere utilizzato in associazione con gli altri farmaci antivirali classici, sfruttando la sua capacità di agire a un livello diverso del processo di replicazione virale. Attualmente questa classe di farmaci anti-retrovirali comprende solo due molecole: il T-20 (o enfuvirtide) e il T-1249. Entrambi sono peptidi sintetici che ostacolano la fusione di gp41 con la membrana ospite: il primo è attualmente in commercio, mentre il secondo è ancora in fase di sperimentazione clinica.

L'uso di sCD38₅₁₋₇₄MBP come farmaco ad uso sistemico richiede tuttavia un ulteriore miglioramento della sua formulazione, volta a migliorare la biodisponibilità del farmaco e rallentare la sua clearance. Una possibilità in corso di studio è la coniugazione del peptide con poli(etilen-glicol) (PEG), un polimero molto studiato per la modificazione covalente di macromolecole biologiche da utilizzare per applicazioni farmaceutiche e biotecnologiche [171]. La coniugazione con PEG, infatti, permette di:

- proteggere epitopi antigenici e immunogenici;
- prevenire la degradazione della molecola attiva da parte di enzimi proteolitici;
- impedire l'assunzione recettore-mediata della molecola attiva da parte del sistema reticolo-endoteliale;
- aumentare il peso molecolare apparente della molecola attiva e ridurre così la filtrazione renale aumentandone la biodistribuzione.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Miedema F, Tersmette M, Van Lier WA. (1990) AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunol. Today*, 11: 293-297.
- [2] Krust B, Laurent AG, Le Guern A, Jeannequin O, Montagnier L, Hovanessian AG. (1988) Characterization of a monoclonal antibody specific for the HIV-1 precursor glycoprotein. *AIDS*. 2:17-24.
- [3] Gomez C, Hope TJ. (2005) The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol.* 7:621-626.
- [4] Dianzani U, Bragardo M, Buonfiglio D, Redoglia V, Funaro A, Portoles P, Rojo J, Malavasi F, Pileri A. (1995) Modulation of CD4 lateral interaction with lymphocyte surface molecules induced by HIV-1 gp120. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1306-1311.
- [5] Bottarel F, Feito MJ, Bragardo M, Bonisconi S, Buonfiglio D, De Franco S, Malvasi F, Bensi T, Ramenghi U, and Dianzani U. (1999). The cell- death-inducing ability of gp120 from different HIV1 strains correlates with their ability to induce CD4 lateral association with CD95 on CD4+ T cells. *AIDS Res Hum Retrov.* 15:1255-63.
- [6] Doms RW, Moore JP. (2000) HIV-1 Membrane Fusion: Targets of Opportunity. *J. Cell Biol.*, **151**.
- [7] BreLOT A, Heveker N, Pleskoff O, Sol N, Alizon M. (1997) Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *J Virol.* 71:4744-51.

- [8] Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J. (1996) CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature*. 384:179-83.
- [9] Shu W, Liu J, Ji H, Radigen L, Jiang S, Lu M. (2000) Helical interactions in the HIV-1 gp41 core reveal structural basis for the inhibitory activity of gp41 peptides. *Biochemistry*. 39:1634-42.
- [10] Purcell DF, Martin MA. (1993) Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol*. 67:6365-78.
- [11] Haseltine WA. (1991) Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J*. 5:2349-60. Review.
- [12] Ivanoff LA, Dubay JW, Morris JF, Roberts SJ, Gutshall L, Sternberg EJ, Hunter E, Matthews TJ, Petteway SR Jr. (1992) V3 loop region of the HIV-1 gp120 envelope protein is essential for virus infectivity. *Virology*. 187:423-32.
- [13] Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montoroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. (1993) HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*, **362**: 355.
- [14] Gaidano G, Pastore C, Lanza C, Mazza U, Saglio G. (1994) Molecular pathology of AIDS-related lymphomas: biologic aspects and clinicopathologic heterogeneity. *Annu. Hematol.*, **69**:281-290.
- [15] Yarchoan R, Venzon DJ, Pluba JM, Lietzau J, Wyvill KM, Tsiatis AA, Steinberg SM, Broder S. (1991) CD4 count as a mortality indicator in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients receiving anti-retroviral

- therapy: experience in a research hospital. *Annals of Internal Medicine*, **115**:184-189.
- [16] Ometto L, Menin C, Masiero S, Bonaldi L, Del Mistro A, D'Andrea E, De Rossi A, Chieco-Bianchi L. (1997) Molecular profile of Epstein-Barr virus in human immunodeficiency virus type 1-related lymphadenopathies and lymphomas. *Blood*, **90**:313-322.
- [17] Smit MS, Bloomer C, Hornat R, Goldstein E, Casparian JM, Chandran B. (1997) Detection of human herpes virus 8 DNA in Kaposi's sarcoma lesion and peripheral blood of human immunodeficiency virus-positive patients and correlation with serologic measurements. *J. Infect Dis.*, **176**: 84-93.
- [18] Campioni D, Corallini A, Zauli C, Possati L, Altavilla G, Barbanti-Brodano G. (1995) HIV type 1 extracellular tat protein stimulates growth and protects cells of BK-virus/Tat transgenic mice from apoptosis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **9**: 1039-1048.
- [19] Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, Fiorelli V, Gendelman R, Morgan RA, Wingfield P, Gallo RC. (1993) Release, uptake and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 tat protein on cell growth and viral transactivation. *J. Virol.* 1993, **67**: 277-287.
- [20] Celeghini C, Marchisio M, Zauli G. (1996) In vivo and in vitro modulatory effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) tat protein on protein kinase C activity. *Int. J. Oncol.* 1996, **8**: 349-354.
- [21] Herndier B, Kaplan AJ, McGrath MS. (1994) Pathogenesis of AIDS lymphoma. *AIDS*, **8**: 1025-1049.
- [22] Gibellini D, Zauli G, Re MC, Milani D, Furlini G, Caramelli E, Capitani S, La Placa M. (1994) Recombinant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)

- tat protein sequentially upregulates IL-6 and TGF-1 β mRNA expression and protein synthesis in peripheral blood monocytes. *Br. J. Haematol*, **88**: 261-267.
- [23] Shiramizu B, Herndier BG, McGrath MS. (1994) Identification of a clonal human immunodeficiency virus integration site in human immunodeficiency virus associated lymphoma. *Cancer Research*, **54**: 2069-2072.
- [24] Capon, DJ, Ward RHR. (1991) The CD4-gp120 interaction AIDS pathogenesis. *Annu.Rev Immunol.*, **9**: 649-678.
- [25] Eiden LE, Lifson JD. (1992) HIV interaction with CD4: a continuum of confirmations and consequences. *Immunol. Today*, **13**:201.
- [26] Clapham PR, Blanc D, Weiss RA. (1991) Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by Simian immunodeficiency virus. *Virology*, **181**:703.
- [27] Weiner DB, Huebner K, Williams WV, Greene MI. (1991) Human genes other than CD4 facilitate HIV-1 infection of murine cells. *Pathobiology*, **59**:361.
- [28] Kedzierska K, Crowe SM. (1991) Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemoter X*, **3**:133-50.
- [29] Kedzierska K, Crowe SM, Turville S, Cunningham AL. (2003) The nfluence of cytokines, chemokines and their recptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Med. Virol.*, **13**:39-56.
- [30] Wyatt R, Sodroski J. (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, **280**:1884-1888.
- [31] Platt E, Madani N, Kozak SL, Kabat D. (1997) Infectious properties of human immunodeficiency type 1 mutants with distinct affinities for the CD4 receptor. *J. Virol.* **71**:883-890.

- [32] Dittmar MT, McKnight A, Simmons G, Clapham, PR, Weiss RA, Simmonds P. (1997) HIV-1 tropism and co-receptor use. *Nature*, **385**:495-496.
- [33] Cohen J. (1997) Exploiting the HIV-chemokine nexus. *Science*, **275**:1261-1264.
- [34] He J, Chen Y, Farzan M., Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J, Yang X, Hofmann W, Newman W, Mackay CR, Sodroski J, Gabuzda D. (1997) CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature*, **385**:645-649.
- [35] Callebaut C, Krust B, Jacotot E, Hovanessian AG. (1993) T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4⁺ cells. *Science*, **262**:2045-2050.
- [36] Oravecz T, Roderiquez G, Koffi J, Wang J, Ditto M, Bou-Habib DC, Lusso P, Norcross MA. (1995) CD26 expression correlates with entry, replication and cytopathicity of monocytotropic HIV-1 strains in a T-cell line. *Nat. Med.*, **1**: 919-926.
- [37] Dukes CS, Yu Y, Rivadeneira ED, Sauls DL, Liao HX, Haynes BF, Weinberg JB. (1995) Cellular CD44S as a determinant of human immunodeficiency virus type 1 infection and cellular tropism. *J. Virol.* **69**: 4000-4005.
- [38] Levine BL, Mosca JD, Riley JL, Carroll RG, Vahey MT, Jagodzinski LL, Wagner KF, Mayers DL, Burke DS, Weislow OS, St Louis DC, June CH. (1996) Antiviral effect and ex vivo CD4⁺ T cell proliferation in HIV-positive patients as a result of CD28 costimulation. *Science* **272**: 1939-1943.
- [39] Frank I, Stoiber H, Godar S, Stockinger H, Steindl F, Katinger HW, Dierich MP (1996) Acquisition of host cell-*surface*-derived molecules by HIV-1. *AIDS* **10**: 1611-1620.

- [40] Allaway GP, Davis-Bruno KL, Beaudry GA. (1995) Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel hetrotetramer which neutralizes primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*; **11**:533–9.
- [41] Franti M, O’Neill T, Maddon P, Burton D, Poignard P, Olson W. (2002) PRO 542 (CD4-IgG2) has a profound impact on HIV-1 replication in the Hu-PBL-SCID mouse model. In: Abstracts of the 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Seattle: abstract 401–T.
- [42] Feito MJ, Bragardo M, Buonfiglio D, Bonissoni S, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U. (1997) gp120s derived from four syncytium-inducing HIV-1 strains induce different patterns of CD4 association with lymphocyte surface molecules. *Int Immunol*. 9:1141-7.
- [43] Dianzani U, Bragardo M, Buonfiglio D, Redoglia V, Funaro A, Portoles P, Rojo J, Malavasi F, Pileri A. (1995) Modulation of CD4 lateral interaction with lymphocyte surface molecules induced by HIV-1 gp120. *Eur J Immunol*. 25:1306-11.
- [44] Frauwirth KA, Thompson CB. (2002) Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J Clin Invest*. 109:295-9. Review.
- [45] Sharpe AH, Freeman GJ. (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2:116-26. Review.
- [46] Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. (2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2:261-8.

- [47] Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.*;14:233-58. Review.
- [48] Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. (1999) B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity.* 11:423-32.
- [49] Okano K, Nitta K, Ogawa S, Horita S, Habiro K, Nihei H, Abe R. (2004) Effects of double blockade of CD28 and inducible-costimulator signaling on anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J Lab Clin Med.* 144:183-92
- [50] Vermeiren J, Ceuppens JL, Van Ghelue M, Witters P, Bullens D, Mages HW, Kroczeck RA, Van Gool SW. (2004) Human T cell activation by costimulatory signal-deficient allogeneic cells induces inducible costimulator-expressing anergic T cells with regulatory cell activity. *J Immunol.* 172:5371-8.
- [51] Bertram EM, Tafuri A, Shahinian A, Chan VS, Hunziker L, Recher M, Ohashi PS, Mak TW, Watts TH. (2002) Role of ICOS versus CD28 in antiviral immunity. *Eur J Immunol.* 32:3376-85.
- [52] Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, Dekruyff RH, Umetsu DT. (2004) Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol.* 5:1149-56.
- [53] Okamoto N, Nukada Y, Tezuka K, Ohashi K, Mizuno K, Tsuji T. (2004) AILIM/ICOS signaling induces T-cell migration/polarization of memory/effector T-cells. *Int Immunol.* 16:1515-22.
- [54] Wassink L, Vieira PL, Smits HH, Kingsbury GA, Coyle AJ, Kapsenberg ML, Wierenga EA. (2004) ICOS expression by activated human Th cells is enhanced by IL-12 and IL-23: increased ICOS expression enhances the effector function of both Th1 and Th2 cells. *J Immunol.* 173:1779-86.

- [55] Vieira PL, Wassink L, Smith LM, Nam S, Kingsbury GA, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, Kapsenberg ML, Wierenga EA. (2004) ICOS-mediated signaling regulates cytokine production by human T cells and provides a unique signal to selectively control the clonal expansion of Th2 helper cells. *Eur J Immunol.* 34:1282-90.
- [56] Wahl P, Schoop R, Horan TP, Yoshinaga SK, Wuthrich RP. (2003) Interaction of B7RP-1 with ICOS negatively regulates antigen presentation by B cells. *Inflammation* 27:191-200.
- [57] Yagi J, Arimura Y, Dianzani U, Uede T, Okamoto T, Uchiyama T. (2003) Regulatory roles of IL-2 and IL-4 in H4/inducible costimulator expression on activated CD4+ T cells during Th cell development. *J Immunol.* 171:783-94.
- [58] Stock P, Akbari O, Berry G, Freeman GJ, Dekruff RH, Umetsu DT. (2004) Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol.* 5:1149-56.
- [59] Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, and Kroczeck RA. (1999) ICOS is an inducible T-cell co-stimulatory molecule structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 397:263-66.
- [60] Buonfiglio D, Bragardo M, Redoglia V, Vaschetto R, Bottarel F, Bonisconi S, Bensi T, Mezzatesta C, Janeway Jr CA, Dianzani U. The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur J Immunol.* 2000 Dec;30(12):3463-7.
- [61] Fauci AS. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. (1996). *Nature.* 384:529-34.

- [62] Pantaleo G and Fauci AS (1995). New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol.* 13: 487-512.
- [63] Melbye M, Biggar RJ, Ebbesen P, Neuland C, Goedert JJ, Lorenzer IB, Skinhoj P, Gallo RC, Blattner WA. (1986) Long-term seropositivity for human T lymphotropic virus type III in homosexual men without acquired immunodeficiency syndrome: development of immunologic and clinical abnormalities: A longitudinal study. *Annu Intern Med.* 104: 496-500.
- [64] Polk BF, Fox R, Brookmeyer R, Kanchanaraska S, Kaslow R, Visscher B, Rinaldo C, Phair J (1987) Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. *N Engl J Med.* 316:61-6.
- [65] Giorgi JV, Fahey JL, Smith DC, Hultin LE, Cheng HL, Mitsuyasu RT, Detels R (1987). Early effects of HIV on CD4 lymphocytes in vivo. *J Immunol.* 138: 3725-30.
- [66] Rosenberg ZF, Fauci AS: Immunopathogenesis of HIV infection. (1991) *FASEB J* 5:2382-90.
- [67] Roos MT, Lange JM, de Goede RE, Coutinho RA, Schellekens PT, Miedema F, Tersmette M (1992). Virus phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *J Infect Dis.* 165:427-32.
- [68] Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, Timms A, Winter M, Baptista L, Johnson MA, Lee CA, Phillips AN, Janossy G (1996). Increased numbers of primed activated CD8⁺CD38⁺CD45R0⁺ T cells predict the decline of CD4⁺ T cells in HIV-1-infected patients. *AIDS.* 10:827-34.

- [69] Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hultin P, Schmid I, Matud JL, Detels R, Giorgi JV (1996). Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: Results of 6 years of follow-up. *Cytometry*. 26:1-7.
- [70] Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV (1997). Elevated CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4⁺ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 16:83-92.
- [71] Diegel ML, Moran PA, Gilliland LK, Damle NK, Hayden MS, Zarling JM, Ledbetter JA. (1993) Regulation of HIV production by blood mononuclear cells from HIV-infected donors: II. HIV-1 production depends on T cell-monocyte interaction. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 9:465-73.
- [72] Levine BL, Mosca JD, Riley JL, Carroll RG, Vahey MT, Jagodzinski LL, Wagner KF, Mayers DL, Burke DS, Weislow OS, St Louis DC, June CH. (1996) Antiviral effect and ex vivo CD4⁺ T cell proliferation in HIV-positive patients as a result of CD28 costimulation. *Science*. 272:1939-43.
- [73] Sanchez-Madrid F, Szklut, P and Springer TA. (1983). Stable hamster-mouse hybridomas producing IgG and IgM hamster monoclonal antibodies of defined specificity. *J Immunol*. 130:309-12.
- [74] Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buonfiglio D, Redoglia V, Bonissoni S, Correr A, Dianzani I, Ramenghi U (1997). Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*. 89:2871-79

- [75] Dianzani U., Bragardo M, Buonfiglio D, Redoglia V, Funaro A, Portoles P, Rojo J, Malavasi F, Pileri. A (1995). Modulation of CD4 lateral interaction with lymphocyte surface molecules induced by HIV-1 gp120. *Eur J Immunol.* 25:1306-11
- [76] Feito MJ, Bragardo M, Buonfiglio D, Bonisconi S, Bottarel F, Malavasi F, and Dianzani U (1997). Gp120s derived from four HIV-1 strains induce different patterns of CD4 association with lymphocyte surface molecules. *Int Immunol* 9:1141-47
- [77] Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Muriel Crouvoiser M, Goujard T, Montagnier L (1996). Programmed cell death in peripheral lymphocytes in HIV-infected persons. *J Immunol* 156:3509-20.
- [78] Ameisen JC, Capron A (1991). T-cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol Today.* 4:102-5.
- [79] Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurre R, Haigwood N, Sekaly RP, Finkel TH (1992). Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med.* 176:1099-106.
- [80] Capon DJ, Ward RH (1991). The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 9: 649-78.
- [81] Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, Debatin KM, Krammer PH (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature.* 375:497-500.
- [82] Redoglia V, Dianzani U, Rojo JM, Portoles P, Bragardo M, Wolff H, Buonfiglio, D, Bonisconi S, and Janeway CA jr. (1996). Characterization of

- H4: a murine T lymphocyte activation molecule functionally associated with the CD3/TCR. *Eur J Immunol.* 26: 2781-89.
- [83] Zhou X, Kubo M, Nishitsuji H, Kurihara K, Ikeda T, Ohashi T, Azuma M, Masuda T, Kannagi M. (2004) Inducible-costimulator-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in CD4(+) T lymphocytes. *Virology.* 325:252-63.
- [84] DeFranco S, Bonissoni S, Cerutti F, Bona G, Bottarel F, Cadario F, Brusco A, Loffredo G, Rabbone I, Corrias A, Pignata C, Ramenghi U, Dianzani U. (2001) Defective function of Fas in patients with type 1 diabetes associated with other autoimmune diseases. *Diabetes.* 50:483-8.
- [85] Comi C, Leone M, Bonissoni S, DeFranco S, Bottarel F, Mezzatesta C, Chiocchetti A, Perla F, Monaco F, Dianzani U. (2000) Defective T cell fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 55:921-7.
- [86] Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. (2001). Critical contribution of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4+ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice. *The Journal of Experimental Medicine* 193: 651-660
- [87] Frauwirth KA, Thompson CB. (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation *The Journal of Clinical Investigation* 109: 295-299.
- [88] Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. (1995). *Nature* 373: 123-126.

- [89] Yeh, WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW. (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 279: 1954-1958.
- [90] Kimberley FC, Screaton GR. (2004) Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res.* 14:359-72. Review.
- [91] Dianzani U, Bensi T, Savarino A, Sametti S, Indelicato M, Mesturini R, Chiocchetti A. (2003) Role of FAS in HIV infection. *Curr HIV Res.* 1:405-17. Review.
- [92] Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S-I, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233-243.
- [93] Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC. (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 10709-10715.
- [94] Krammer PH. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795.
- [95] Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling *Science* 288: 2351-2354.
- [96] Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. (2000). Fas preassociation required for apoptosis

- signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288: 2354-2357.
- [97] Yeh, WC, Pompa JL, McCurrach ME, Shu HB, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW. (1998). *Science* FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis 279: 1954-1958.
- [98] Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*. 392: 296-300.
- [99] Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9: 267-276.
- [100] Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, Gazdar A, Blenis J, Arnott D, Ashkenazi A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 46639-46646.
- [101] Parlato S, Giammarioli AM, Logozzi M, Lozupone F, Matarrese P, Luciani F, Falchi M, Malorni W, Fais S. (2000). CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *The EMBO Journal* 9: 5123-5134.
- [102] Scheel-Toellner D, Wang K, Singh R, Majeed S, Raza K, Curnow SJ, Salmon M, Lord JM. (2002). The death-inducing signalling complex is recruited to

- lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 297: 876-879.
- [103] Luo X., Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. (1998). *Cell* 94: 481-490.
- [104] Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, KJ., Debatin, KM., Krammer, PH., Peter, M. E.(1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal* 17:1675-1687.
- [105] Gajate C, Mollinedo F. (2001). The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 98: 3860-3863.
- [106] De Maria R, Lenti L, Malisan F, d'Agostino F, Tomasini B, Zeuner A, Rippon MR, Testi R. (1997). Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277: 1652-1655.
- [107] Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 11549-11556.
- [108] Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413.
- [109] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. (1997). *Cell* 91: 479-489.
- [110] Thornberry NA, Lazebnik Y. (1998). Caspases: enemies within *Science* 281: 1312-1316.

- [111] Gross A., McDonnell, Korsmeyer SJ. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes and Development* 13: 1899-1911.
- [112] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer S. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369: 321-323.
- [113] Adams JM, Cory S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Science* 26: 61-66.
- [114] Inohara N, Gourley TS, Carrio R, Muniz M, Merino J, Garcia I, Koseki T, Hu Y, Chen S, Nunez G. (1998). Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 32479-32486.
- [115] Song Q, Kuang Y, Dixit VM, Vincenz C. (1999). Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *The EMBO Journal* 18: 167-178.
- [116] Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, Jiang RF, Markos K, Davidson W, Scott DW, Shi YF. (2000). Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacological Therapy* 88: 333-347.
- [117] Nagata S. (1997). Apoptosis by Death Factor *Cell* 88: 355-365.
- [118] Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Molecular and Cellular Biology* 22: 207-220 .
- [119] Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. (1994). Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 263: 1759-1762.

- [120] Hu S, Vincenz C, Buller M, Dixit VM. (1997). A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 9621-9624.
- [121] Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schröter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. (1997). *Nature* 388: 190-195.
- [122] Fackler OT, Baur AS. (2002). Live and let die: Nef functions beyond HIV replication. *Immunity* 16: 493-497.
- [123] Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buonfiglio D, Redoglia V, Bonisconi S, Correria A, Dianzani I, Ramenghi U. (1997). Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 89: 2871-2879.
- [124] Yang Y, Bailey J, Vacchio MS, Yarchoan R, Ashwell JD. (1995) Retinoic acid inhibition of ex vivo human immunodeficiency virus-associated apoptosis of peripheral blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 3051-3055
- [125] Fisher GN, Rosemberg FJ, Strans SF, Dale JK, Middleton LA, Lin A., Strober W, Lenardo MJ, Puck JM. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81: 935-946.
- [126] Rathmell JC, Thompson CB. (2002). Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109 Suppl: S 97-107.

- [127] Tresoldi E, Romiti ML, Boniotto M, Crovella S, Salvatori F, Palomba E, Pastore A, Cancrini C, de Martino M, Plebani A, Castelli G, Rossi P, Tovo PA, Amoroso A, Scarlatti G; (2002) European Shared Cost Project Group; Italian Register for HIV Infection in Children. Prognostic value of the stromal cell-derived factor 1 3'A mutation in pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis.* 185:696-700.
- [128] Sei S, Boler AM, Nguyen GT, Stewart SK, Yang QE, Edgerly M, Wood LV, Brouwers P, Venzon DJ. (2001) Protective effect of CCR5 delta 32 heterozygosity is restricted by SDF-1 genotype in children with HIV-1 infection. *AIDS.* 15:1343-52.
- [129] Anzala AO, Ball TB, Rostron T, O'Brien SJ, Plummer FA, Rowland-Jones SL. (1998) CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research. *Lancet.* 351:1632-3.
- [130] Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, Wang CE, Sheppard HW. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med.* 1997 Oct;3(10):1160-2.
- [131] Sytwu HK, Liblau RS, McDevitt HO. (1996). The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity.* 5: 17-30.
- [132] Liston P, Roy N, Tamai K. (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 379: 349–353.
- [133] Alexander L, Du Z, Rosenzweig M, Jung JU, Desrosiers RC. (1997). A role for natural simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency

- virus type 1 nef alleles in lymphocyte activation. *Journal of Virology* 71: 6094-6099.
- [134] Schragger JA, Marsh JW. (1999). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 8167-8172.
- [135] Baker SJ, Reddy EP. (1998). Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261-3270.
- [135] Li X, Yang Y, Ashwell JD. (2002). TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416: 345-347.
- [136] Dianzani U, Funaro A, Di Franco D, Garbarino G, Bragardo M, Redoglia V, Buonfiglio D, De Monte LB, Pileri A, Malavasi F. (1994) Interaction between endothelium and CD4⁺CD45RA⁺ lymphocytes: role of the human CD38 molecule. *J. Immunol.* 153:952-959.
- [137] Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF, Lund FE, Santos-Argumedo L, Parkhouse RME, Walseth TF, Lee HC. (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* **262**: 1056-1059.
- [138] Morra M, Zubiaur M, Terhost J, Sancho J, Malavasi F. (1998) CD38 is functionally dependent of TCR/CD3 complex in human T cells. *FASEB J.* **330**: 1129-1135.
- [139] Deaglio S, Morra M, Mallone R, Ausiello CM, Prager E, Gambarino G, Dianzani U, Stockinger H, Malavasi F. (1998) Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J. Immunol.* **160**: 1106-1115.
- [140] Da Silva CP, Schweitzer K, Heyer P, Malavasi F, Mayr GW, Guse AH (1998) Ectocellular CD38-catalyzed synthesis and intracellular Ca²⁺-signalling

activity of cyclic ADP-ribose in T-lymphocytes are not functionally related.
Immunol. Rev. **161**: 79-93.

- [141] Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hultin P, Schmidt I, Matud JL, Detels R, Giorgi JV (1996) Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8⁺ cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up. *Cytometry* **26**: 1-7.
- [142] Autran B, Carcelain C, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debré P, Leibowitch J. (1997) Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4⁺ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* **277**: 112-116.
- [143] Viganò A, Saresella M, Rusconi S, Ferrante P, Clerici M. (1998) Expression of CD38 on CD8 T cells predicts maintenance of high viraemia in HAART-treated HIV-1-infected children. *Lancet* **352**: 1905-1906.
- [144] De Martino M, Rossi ME, Azzari C, Gelli MG, Galli L, Vierucci A. (1998) Different meaning of CD38 molecule expression on CD4⁺ and CD8⁺ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type-1 infection surviving more than five years. *Pediatr. Res.* **43**: 752-758.
- [145] Sirera R, Bayona A, Carbonell F, Perez-Tamarit D, Otero MC, Asensi F, Gonzalez-Molina A. (1998) The expression of CD38 and DR are markers of immune activation and disease progression in HIV⁺ children. *12th World AIDS Conference*, Geneva, Switzerland, June 28-July 3 1998, Abs. N° 213*/31166, p. 528.
- [146] Savarino A, Pugliese A, Martini C, Pich PG, Pescarmona GP, Malavasi F. (1996) Investigation of the potential role of membrane CD38 in protection against cell death induced by HIV-1. *J. Biol. Reg. Homeost. Agents* **10**:13-18.

- [147] Mehta K, Shahid U, Malavasi F. (1996) Human CD38, a cell surface molecule with multiple functions. *FASEB J.* **10**: 1408-1417.
- [148] Allaway GP, Davis-Bruno KL, Beaudry GA. (1995) Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel hetrotetramer which neutralizes primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*; **11**:533–9.
- [149] Franti M, O'Neill T, Maddon P, Burton D, Poignard P, Olson W. (2002) PRO 542 (CD4-IgG2) has a profound impact on HIV-1 replication in the Hu-PBL-SCID mouse model. In: *Abstracts of the 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*. Seattle: abstract 401–T.
- [150] Savarino A, Bottarel F, Calosso L, Feito MJ, Bensi T, Bragardo M, Rojo JM, Pugliese A, Abbate I, Capobianchi MR, Dianzani F, Malavasi F, Dianzani U. (1999) Effects of the human CD38 glycoprotein on the early stages of the HIV-1 replication cycle. *FASEB J* **13**:2265-76.
- [151] Hoshino S, Kukimoto I, Kontani K, Inoue S, Kanda Y, Malavasi F, Katada T. (1997) Mapping of the catalytic and epitopic sites of human CD38/NAD⁺ glycohydrolase to a functional domain in the carboxyl terminus. *J Immunol.* **158**:741-7.
- [152] Choe H, Farazan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, MaCkay CR, La Rosa G, Newman W et al. (1996) The beta chemokine receptor CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* **85** 1135-1148.
- [153] Shiramizu B, Herndier BG, McGrath MS. (1994) Identification of a clonal human immunodeficiency virus integration site in human immunodeficiency virus associated lymphoma. *Cancer Research*, **54**: 2069-2072.
- [154] Dittmar MT, McKnight A, Simmons G, Clapham, PR, Weiss RA, Simmonds P. (1997) HIV-1 tropism and co-receptor use. *Nature*, **385**:495-496.

- [155] Kedzierska K, Crowe SM. (1991) Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemoter X*, **3**:133-50.
- [156] Morgenstern, B. (1999) DIALIGN 2: improvement of the segment-to-segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **15**, 211–218
- [157] Tam JP. (1998) Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5409-5413.
- [158] Yahi N, Fantini J, Baghdiguian S, Mabrouk K, Tamalet C, Rochat H, Van Rietschoten J, Sabatier JM. (1995) SPC3, a synthetic peptide derived from the V3 domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120, inhibits HIV-1 entry into CD4+ and CD4- cells by two distinct mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4867-4871.
- [159] Posnett DN, McGrath H, Tam JP. (1988) A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. *J. Biol. Chem.* **263**, 1719-1725.
- [160] Savarino A, Bottarel F, Malavasi F and Dianzani U. (2000) Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *AIDS* 2000,**14**, 1079-1083.
- [161] Howard, M., Grimaldi, J. C., Bazan, J. F., Lund, F. E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R. M. E., Walseth, T. F., and Lee, H. C. (1993) Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* **262**: 1056-1059.
- [162] Savarino, A., Bottarel, F., Calosso, L., Feito, M. J., Bensi, T., Bragardo, M., Rojo, M. J., Pugliese, A., Abbate, I., Capobianchi, M. R., Dianzani, F.,

- Malavasi, F. and Dianzani, U. (1999) Effects of the human CD38 glycoprotein on the early stages of the HIV-1 replication cycle. *FASEB J.* **13**, 2265-2276
- [163] Hoffman, N. G., Seillier-Moiseiwitsch, F., Ahn, J., Walker, J. M. and Swanstrom, R. (2002) Variability in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Env Protein Linked to Phenotype-Associated Changes in the V3 Loop. *J. Virol.* **76**, 3852-3864.
- [164] Choe, H., Farazan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. and Sodroski, J. (1996) The beta chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148.
- [165] Wu, L., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A. A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C. and Sodroski, J. (1996) CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-183.
- [166] Hara-Yokoyama, M., Kukimoto, I., Nishina, H., Kontani, K., Hirabayashi, Y., Irie, F., Sugiya, H., Furuyama, S. and Katada, T. (1996) Inhibition of NAD⁺ glycohydrolase and ADP-ribosyl cyclase activities of leukocyte cell surface antigen CD38 by gangliosides. *J Biol Chem* **271**, 12951-12955.
- [167] Cherukuri, A., Dykstra, M. and Pierce, S. K. (2001) Floating the raft hypothesis: lipid rafts play a role in immune cell activation. *Immunity* **14**, 657-660.
- [168] Bragardo, M., Buonfiglio, D., Feito, M. J., Bonisconi, S., Redoglia, V., Rojo, J. M., Ballester, S., Portoles, P., Garbarino, G., Malavasi, F., and Dianzani, U. (1997) Modulation of lymphocyte interaction with endothelium and homing by HIV-1 gp120. *J. Immunol.* **159**, 1619-1627.

- [169] Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hultin P, Schmidt I, Matud JL, Detels R, Giorgi JV (1996) Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8+ cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up. *Cytometry* **26**: 1-7.
- [170] Wyatt R, Sodroski J. (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, **280**:1884-1888.
- [171] Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM. (2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **54** 459-476.
- [172] Hoffman NG, Seilier-Moiseiwitsc F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom M. (2002) Variability in the Human Immunodeficiency virus type 1 gp120 env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J.Virol.* **76**, 3852-3864.
- [173] Choe H, Farazan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, MaCkay CR, La Rosa G, Newman W et al. (1996) The beta chemokine receptor CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* **85** 1135-1148.
- [174] Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Paroling C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, et al. (1996) CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384** 179-183.
- [175] Hammache D, Pieroni G, Yahi N, Delezay O, Koch N, Lafont H, Tamalet C, Fantini J. (1998) Specific interaction of HIV-1 and HIV-2 surface envelope glycoproteins with monolayers of galactosylceramide and ganglioside GM3. *J. Biol. Chem.* **273** 7967-7971.
- [176] Hara-Yokoyama M, Kukimoto I, Nishina H, Kontani K, Hirabayashi Y, Irie F, Sugiya H, Furuyama F, Katada T. (1996) Inhibition of NAD⁺glycohydrolase

- and ADP-ribosyl cyclase activities of leukocyte cell surface antigen CD38 by gangliosides. *J. Biol. Chem.* **271** 12951-12955.
- [177] Zubiaur, M., Fernandez, O., Ferrero, E., Salmeron, J., Malissen, B., Malavasi, F. and Sancho, J. (2002) CD38 is associated with lipid rafts and upon receptor stimulation leads to Akt/protein kinase B and Erk activation in the absence of the CD3-zeta immune receptor tyrosine-based activation motifs. *J Biol Chem* **277**, 13-22.
- [178] Mañes, S., del Real, G., Lacalle, R. A., Lucas, P., Gómez-Moutón, C., Sánchez-Palomino, S., Delgado, R., Alcamí, J., Mira, E. and Martínez-A, C. (2000). Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Reports* **1**, 190-196.
- [179] Benjouad, A., Chapuis, F., Fenouillet, E. and Gluckman, J. C. (1995) Multibranched peptide constructs derived from the V3 loop of envelope glycoprotein gp120 inhibit human immunodeficiency virus type 1 infection through interaction with CD4. *Virology* **206**: 457-464
- [180] Dettin, M., Scarinci, C., Seraglia, R. and Di Bello, C. (1997) Investigations using photo affinity labeled analogues confirm the binding between sCD4 and the PND of HIV-1, MN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**, 584-588.
- [181] Rabehi, L., Seddiki, N., Benjouad, A., Gluckman, J.C. and Gattegno, L. (1998) Interaction of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein V3 loop with CCR5 and CD4 at the membrane of human primary macrophages. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 1605-161539.
- [182] Moir, S., Perreault, J. and Poulin, L. (1996) Postbinding events mediated by human immunodeficiency virus type 1 are sensitive to modifications in the D4-transmembrane linker region of CD4. *J. Virol.* **70**, 8019-8028.

- [183] Denisova, G., Raviv, D., Mondor, I., Sattentau, Q. J. and Gershoni, J. M. (1997) Conformational transitions in CD4 due to complexation with HIV envelope glycoprotein gp120. *J. Immunol.* **158**, 1157-1164
- [184] Myszka, D. G., Sweet, R. W., Hensley, P., Brigham-Burke, M., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A., Wyatt, R., Sodroski, J., and Doyle, M. L. (2000) Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9026-9031.
- [185] Kwong, P. D., Wyatt, R., Sattentau, Q. J., Sodroski, J. and Hendrickson, W. A. (2000) Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol* **74**, 1961-1972.
- [186] Dianzani, U., Bragardo, M., Buonfiglio, D., Redoglia, V., Funaro, A., Portoles, P., Rojo, J., Malavasi, F., and Pileri, A. (1995) Modulation of CD4 lateral interaction with lymphocyte surface molecules induced by HIV-1 gp120. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1306-1311.
- [187] Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, Reinhart TA, Rogan M, Cavert W, Miller CJ, Veazey RS, Notermans D, Little S, Danner SA, Richman DD, Havlir D, Wong J, Jordan HL, Schacker TW, Racz P, Tenner-Racz K, Letvin NL, Wolinsky S, Haase AT. (1999) Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science.* 286:1353-7.

PUBBLICAZIONI PERTINENTI ALLA TESI:

- [1] Dianzani U, Bensi T, Savarino A, Sametti S, Indelicato M, Mesturini R, Chiocchetti A. (2003) Role of FAS in HIV infection. *Curr HIV Res.* 1:405-17. Review.
- [2] Savarino A, Bensi T, Chiocchetti A, Bottarel F, Mesturini R, Ferrero E, Calosso L, Deaglio S, Ortolan E, Butto S, Cafaro A, Katada T, Ensoli B, Malavasi F, Dianzani U. (2003) Human CD38 interferes with HIV-1 fusion through a sequence homologous to the V3 loop of the viral envelope glycoprotein gp120. *FASEB J.* 17:461-3.
- [3] Bottarel F, Bonisconi S, Lucia MB, Bragardo M, Bensi T, Buonfiglio D, Mezzatesta C, DiFranco D, Balotta C, Capobianchi MR, Dianzani I, Cauda R, Dianzani U. (2001) Decreased function of Fas in patients displaying delayed progression of HIV-induced immune deficiency. *Hematol J.* 2:220-7.
- [4] Buonfiglio D, Bragardo M, Redoglia V, Vaschetto R, Bottarel F, Bonisconi S, Bensi T, Mezzatesta C, Janeway Jr CA, Dianzani U. (2000) The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur J Immunol.* 30:3463-7.
- [5] Lucia MB, Buonfiglio D, Bottarel F, Bensi T, Rutella S, Rumi C, Ortona L, Janeway CA Jr, Cauda R, Dianzani U. (2000) Expression of the novel T cell activation molecule hpH4 in HIV-infected patients: correlation with disease status. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16:549-57.

ALTRE PUBBLICAZIONI:

- [1] Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, Castelli L, Bottarel F, Mazzarino MC, Garbarini L, Giacopelli F, Valesini G, Santoro C, Dianzani I, Ramenghi U, Dianzani U. (2004) High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*. 103:1376-82.