

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Biomediche e Neuromotorie

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale: 06/A3

Settore Scientifico Disciplinare: MED/07

HIV E RESERVOIR

Presentata da: Dott.ssa Alessia Bertoldi

Coordinatore Dottorato

Supervisore

Chiar.mo Prof. Pietro Cortelli

Chiar.ma Prof.ssa Maria Carla Re



Esame finale anno 2019

ABSTRACT

Il maggiore ostacolo all'eradicazione di HIV è la presenza del reservoir virale trascrizionalmente silente ma in grado di replicare e difficilmente accessibile alla terapia. Reservoir di piccole dimensioni correlano con una prognosi migliore e una minor probabilità di rebound virologico in caso di semplificazione di terapia. La quantificazione del reservoir risulta pertanto essenziale per valutare la reale efficacia della terapia.

La quantificazione dell'HIV-DNA totale (circolare e integrato) rappresenta una metodica semplice e ampiamente utilizzata per quantificare il reservoir, nonostante ne sovrastimi le reali dimensioni includendo genomi difettivi.

Pertanto, inizialmente abbiamo ottimizzato dei metodi per la quantificazione delle forme circolari di HIV-DNA. La forma circolare 2-LTR è stata misurata con successo; ciò non è stato possibile per la forma 1-LTR a causa di omologie di sequenza con il DNA genomico. Come parte di uno studio attualmente in corso, sette pazienti sono stati arruolati alla diagnosi (T0) e seguiti con prelievi a 6(T1), 12(T2), 18(T3) e 24(T4) mesi dopo l'inizio della terapia. Dati preliminari ottenuti nel primo anno (T0,T1,T2) mostrano un andamento dell'HIV-DNA totale stabile nel tempo ($P>0,1$); analogamente, la forma 2-LTR non mostra aumenti significativi tra T0 e T1 ($P>0,5$). Tuttavia, a T0 è stata osservata una differenza statisticamente significativa tra l'HIV-DNA totale e la forma 2-LTR ($P<0,05$).

La seconda parte dello studio si è focalizzata sul saggio TILDA, un metodo in grado di misurare esclusivamente virus competenti la replicazione. Abbiamo adattato questa metodica alle nostre condizioni sperimentali eseguendola su 3 pazienti HIV-positivi.

Infine, considerando il costante aumento dei casi di infezione con sottotipi non-B e che il saggio TILDA è stato sviluppato principalmente per il sottotipo B, il protocollo è stato modificato in modo da rilevare il sottotipo C, il più diffuso a livello mondiale. In particolare, è stato eseguito con successo su 3 pazienti infetti con il sottotipo C.

SOMMARIO

ABSTRACT	2
1. INTRODUZIONE	5
1.1 HIV	6
1.1.1 TASSONOMIA	6
1.1.2 STRUTTURA	7
1.1.3 GENOMA.....	8
1.1.4 PROTEOMA.....	9
1.1.5 CICLO REPLICATIVO	17
1.2 PATOGENESI DI HIV	25
1.2.1 DIAGNOSI VIROLOGICA E IMMUNOLOGICA.....	28
1.3 TERAPIA ANTIRETROVIRALE	30
1.4 LATENZA	34
1.4.1 RESERVOIR ANATOMICI.....	37
1.4.2 PRINCIPALI METODICHE PER LA QUANTIFICAZIONE DEL RESERVOIR.....	39
2. OBIETTIVO	45
3. MATERIALI E METODI	47
3.1 QUANTIFICAZIONE DELL'HIV DNA.....	47
3.1.1 HIV-1 DNA TOTALE	47
3.1.2 QUANTIFICAZIONE DELLA FORMA CIRCOLARE 1-LTR	47
3.1.3 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE 2-LTR e QUANTIFICAZIONE DELLA FORMA CIRCOLARE 2-LTR	51
3.2 TILDA	53
3.3 ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI E UTILIZZO DEI CAMPIONI	55
3.4 ISOLAMENTO E COLTURA DEI PBMCs (SANI E DA PAZIENTE) E DELLE LINEE CELLULARI.....	55
3.5 ANALISI STATISTICA	56
4. RISULTATI	57
4.1.1 HIV DNA 1-LTR E 2-LTR: ALLESTIMENTO DEI SAGGI DI QUANTIFICAZIONE	57
4.1.2 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE pUC-2LTR	60
4.1.3 COSTRUZIONE DELLA CURVA STANDARD DEL pUC-2LTR.....	61
4.2.1 ACCURATEZZA E PERFORMANCE DEL SAGGIO TILDA.....	63
4.2.2 QUANTIFICAZIONE DEL RESERVOIR VIRALE MEDIANTE TILDA IN PAZIENTI VIROSOPPRESSI	65
4.2.3 ADATTAMENTO DEL SAGGIO TILDA AL SOTTOTIPO C DI HIV-1	66
4.2.4 TILDA E REAL TIME PCR NEL SOTTOTIPO C DI HIV-1	67

4.3 QUANTIFICAZIONE DELL'HIV DNA TOTALE E DELLE 2-LTR IN PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO CLINICO N. 245/2016/O/Oss.....	69
5. CONCLUSIONI	71
6. BIBLIOGRAFIA	77

1. INTRODUZIONE

HIV, o Human Immunodeficiency Virus, è noto per essere l'agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Fu descritto per la prima volta in seguito a una serie di morti atipiche legate ad infezione da *Pneumocystis carinii*, agente noto per essere un patogeno aggressivo nei confronti di persone immunodepresse (Gottlieb et al. 1981). Pochi anni dopo, nel 1983, HIV fu isolato e descritto per la prima volta (Barré-Sinoussi et al. 1983, Gallo et al. 1983). L'AIDS rappresenta invece lo stadio terminale dell'infezione, conseguenza della severa e prolungata compromissione del sistema immunitario, che si manifesta con la comparsa di infezioni opportunistiche e neoplasie.

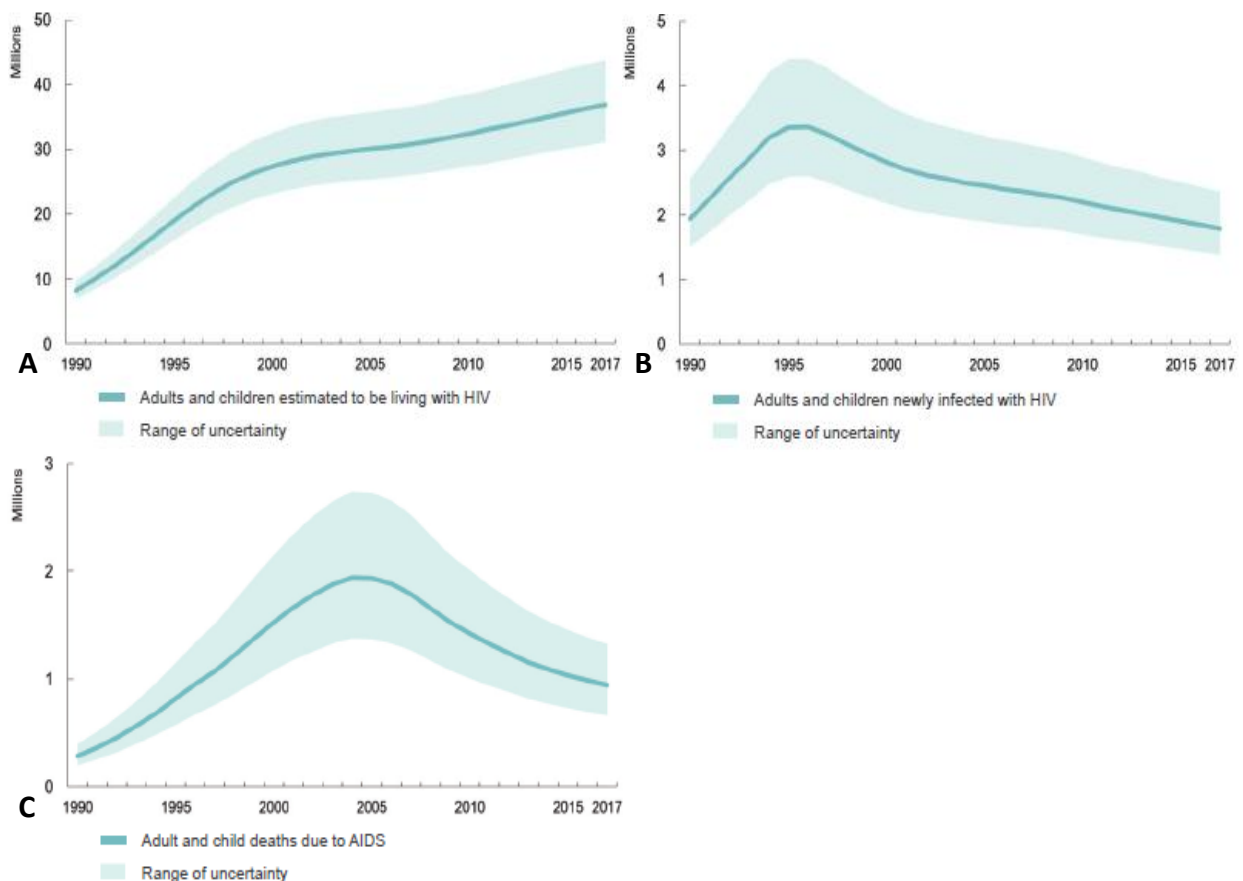


Figura 1. A) Dati epidemiologici sull'andamento dell'infezione da HIV a livello mondiale dal 1990 al 2016. A) Pazienti infetti; B) nuove infezioni C) morti legate all'infezione da HIV (UNAIDS 2018).

Nonostante il notevole incremento del numero di persone nel mondo che vivono con l'HIV dal 1990 (8 milioni) ad oggi (36.9 milioni, del quali la maggior parte residenti nell'Africa Sub-Sahariana) (fig. 1A), negli ultimi anni si sta assistendo ad un progressivo declino a livello globale delle nuove infezioni e delle morti legate all'AIDS (fig.1B e C).

In particolare, dati epidemiologici riguardanti l'Italia hanno evidenziato che, nel 2017, l'infezione da HIV ha interessato circa 130 000 persone; inoltre, si osserva un costante calo delle nuove infezioni dal 2005 al 2017 e un declino ancora più importante delle morti legate all'AIDS che in 12 anni risultano dimezzate (UNAIDS 2018).

La trasmissione, che avviene per scambi di fluidi corporei attraverso vie di continuità, può avvenire principalmente per via sessuale e per via ematica. Soprattutto nei paesi in via di sviluppo invece, il rischio di trasmissione verticale rimane molto alto: può avvenire nel corso della gravidanza, durante il parto o durante l'allattamento (Hladik and McElrath 2008; Cohen et al, 2011).

1.1 HIV

1.1.1 TASSONOMIA

La famiglia dei Retroviridae viene suddivisa in due sottofamiglie: Orthoretrovirinae e Spumaretrovirinae. Gli Orthoretrovirinae sono a loro volta suddivisi in Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon-retrovirus ed i Lentivirus. HIV appartiene al genere Lentivirus.

HIV si suddivide in due tipi, HIV-1 e HIV-2. Il primo è quello maggiormente diffuso a livello mondiale e probabilmente è stato trasmesso dagli scimpanzé mentre HIV-2, la cui diffusione è confinata prevalentemente all'Africa occidentale, è più simile a ceppi isolati da Sooty Mangabey e si contraddistingue per la minor virulenza e una progressione della malattia più lenta (Sharp and Hahn, 2011).

HIV-1 si divide in quattro gruppi: M, N, O, P. Il gruppo M, causa principale della diffusione pandemica di HIV, è a sua volta suddiviso in nove sottotipi, A-D, F-H, J e K (Marteens et al. 2014). Il sottotipo C è quello maggiormente diffuso e interessa prevalentemente le aree dell'Africa e dell'India. Il sottotipo B, invece, è quello predominante nell'Europa occidentale e in particolare in Italia (Magiorkins et al. 2016).

HIV-2 invece si suddivide principalmente in 2 gruppi, A e B (Sharp and Hahn, 2011).

Infine, a causa dell'elevata variabilità genetica legata all'alto tasso di errore della trascrittasi inversa di questo virus, esiste un numero in continuo aumento di forme virali ricombinanti circolanti (Circulating Recombinant Forms, CRFs) (Taylor et al. 2008).

1.1.2 STRUTTURA

HIV è un virus a RNA. Il genoma, le cui dimensioni si aggirano attorno ai 9,7 kb, è composto di due filamenti di RNA a polarità positiva racchiusi all'interno di un virione di circa 120 nm. Il virione si presenta come una sfera al cui interno è racchiuso il capsid di forma conica. Un doppio strato fosfolipidico derivante dalla membrana cellulare della cellula ospite forma l'*envelope* del virus e si genera in seguito alla fuoriuscita (*budding*) della neoformata particella virale. L'*envelope* è formato oltre che da proteine di superficie di derivazione cellulare, anche da complessi trimerici di proteina virale envelope (Env). Ciascuna subunità di Env è formata da una glicoproteina più esterna, nota come gp120, e una glicoproteina di localizzazione transmembranale detta gp41. Gp120, che per la sua localizzazione è nota anche come SU, è essenziale per il legame del virus con la cellula ospite mentre gp41, conosciuta anche come TM per la sua localizzazione transmembrana, ricopre un ruolo critico durante la fusione virale (fig. 2) (Gelderblom, 1991; Parren et al. 1999).

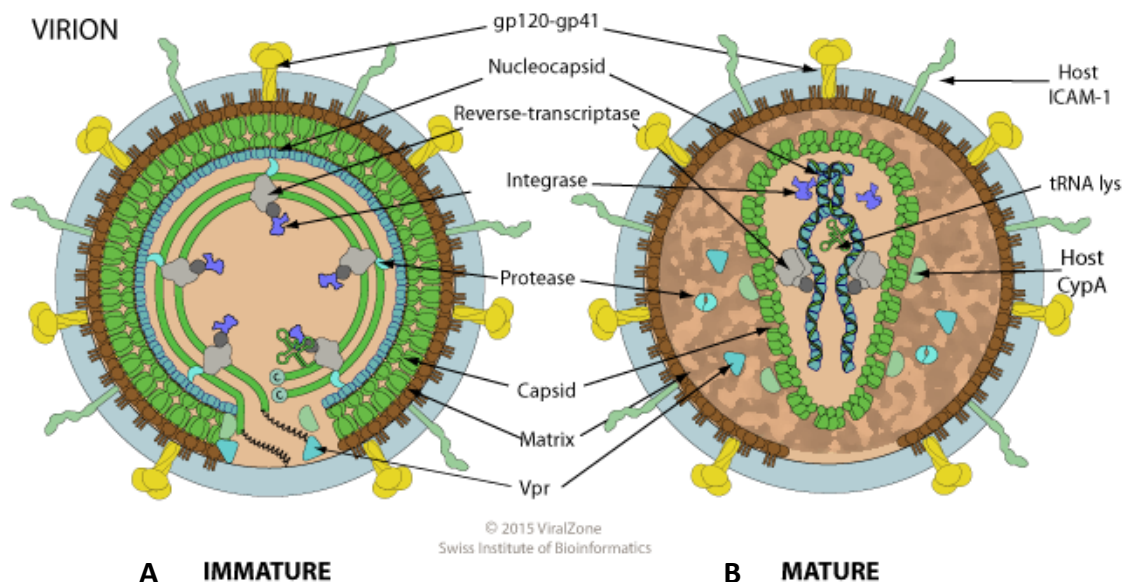


Figura 2. Rappresentazione schematica del virione (A) immaturo e (B) maturo (ViralZone).

L'interazione tra queste due glicoproteine forma i cosiddetti spikes, ovvero esameri costituiti da tre molecole di gp41 e tre molecole più esterne di gp120. Inoltre, gp41 è associata ad

un'altra proteina localizzata internamente rispetto all'envelope, nota come gp17 o MA in quanto forma la matrice che separa l'envelope dal capsido vero e proprio. Come già accennato, il capsido si presenta di forma conica, è composto da una proteina nota come p24 o CA e racchiude due filamenti di RNA a polarità positiva che rappresentano il genoma del virus (Niedrig et al. 1994). Il materiale generico è strettamente associato alle proteine del nucleocapside (p7 o NC) così come la trascrittasi inversa, l'integrasi e due tRNA_{lys3} che serviranno come primer per la trascrittasi inversa (Huang et al, 1994; Levy 2007). Ogni virione contiene anche la proteasi virale e alcune proteine accessorie quali per esempio Vif, Vpr e Nef le cui funzioni verranno approfondite in seguito (La Placa, 2014).

1.1.3 GENOMA

HIV è un virus a RNA a singolo filamento e polarità positiva. La molecola di RNA presenta un capping al 5' e una coda di poli-A al 3'. All'interno di ogni virione sono presenti due di queste molecole appaiate all'estremità 5' in modo da favorirne l'incorporazione al momento dell'assemblaggio della particella virale. A livello di questa regione troviamo una sequenza nota come *primer binding site* (PBS) in cui si lega un tRNA di origine cellulare che fungerà da innesco per la trascrittasi inversa (Widłak and Garrard 1998).

Una volta all'interno della cellula ospite, il genoma di HIV viene retrotrascritto in una molecola di DNA complementare grazie all'azione della trascrittasi inversa virale e di elementi cellulari. Il provirus è formato dai tre geni principali comuni tra i retrovirus (*gag*, *pol* ed *env*) che codificano per proteine strutturali, due geni che codificano per le proteine regolatorie Tat e Rev e quattro che codificano per le proteine accessorie Nef, Vif, Vpr e Vpu (Frankel and Young 1998, De Guzman et al. 1998).

Alle estremità di questa sequenza di geni sono presenti due regioni simili note come *long terminal repeats* (LTRs). Nonostante le analogie di sequenza, queste regioni non sono identiche e si distinguono pertanto in 5'LTR, localizzata all'estremità 5' e ricca di siti per promuovere e regolare la trascrizione, e 3'LTR, localizzata al 3' e contenente siti terminatori per la trascrizione virale.

La molecola di RNA virale presenta una sequenza ripetuta che è presente ad entrambe le sue estremità (sequenza R); all'estremità 5' troviamo una sequenza unica più interna rispetto la sequenza R detta U5, mentre al 3' è presente una sequenza caratteristica detta U3

localizzata più internamente rispetto la sequenza R. In seguito a eventi di appaiamento legati alla retrotrascrizione, la molecola di DNA virale che si viene a formare presenta alle proprie estremità due sequenze composte dalla successione di queste regioni, U3, R e U5, note anche come LTRs (fig. 3) (Widłak and Garrard 1998).

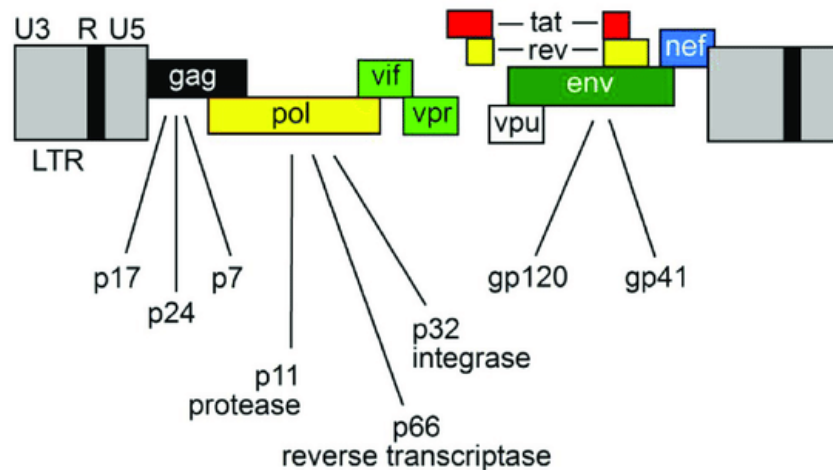


Figura 3. Esempificazione della suddivisione del genoma di HIV (Felli et al. 2017).

5'LTR oltre a contenere numerosi siti di legame per diversi fattori di trascrizione (TFs), può essere ulteriormente suddivisa in 4 domini funzionali: una regione modulatoria, una sequenza *enhancer*, la regione del promotore che contiene la TATA box e una regione leader in cui troviamo TAR (regione transattivante altamente conservata). L'azione concertata di diversi enzimi e molecole su questi domini funzionali garantisce l'attivazione della trascrizione del genoma virale a livelli adeguati e la produzione di RNA messaggeri completi (Garcia et al. 1989).

Diversamente dai comuni retrovirus, tra gli mRNA che HIV può generare si possono trovare non solo *unspliced* e *singly spliced* mRNAs ma anche *multiply spliced* mRNAs (Kim et al. 1989; Exline et al. 2008).

1.1.4 PROTEOMA

Il genoma di HIV contiene tre geni principali, *gag*, *pol* ed *env*, che codificano per le corrispettive poliproteine che, attraverso modifiche, vengono scisse in modo da generare le proteine funzionali definitive.

Gag-pol vengono inizialmente co-tradotti in un'unica poliproteina di 180 kDa (p180) che successivamente viene scissa in una proteina di 55 kDa, p55 ovvero il precursore di quelle che saranno poi le proteine codificate da *gag*, e negli enzimi virali. A partire dalla poliproteina **Gag** si vengono così a formare una proteina di 17 kDa o p17, una di 24 kDa o p24, la p7 e la p6 (Massiah et al. 1994).

La **p17** è una proteina miristilata che forma la matrice (MA) ed è presente all'interno dell'envelope del virus stabilizzando la particella virale (Tedbury and Freed, 2014) mentre la **p24** non è altro che la proteina capsidica che compone il capside virale di forma conica. Questa proteina che forma il core di HIV è uno degli antigeni più rappresentativi e di grande rilevanza nell'iter diagnostico (core-antigen o CA) (Zhao et al. 2013).

p7 è la proteina del nucleocapside (NC) che si complessa con le molecole di RNA all'interno del virione neoformato; è in grado di riconoscere il cosiddetto segnale di localizzazione lineare nella regione 5' dell'RNA virale il quale, a sua volta, è sufficiente a mediare l'incorporazione delle molecole di RNA all'interno del virus (Muriaux and Darlix, 2010).

Infine, **p6** è coinvolta nel rilascio delle particelle virali dalla cellula infetta in quanto contiene una regione nota come *late domain* e media l'interazione tra la p55 e la proteina accessoria Vpr (Meng and Lever, 2013; Kudoh et al. 2014).

Gli enzimi virali derivano invece dalla poliproteina **Pol** e vengono incorporati all'interno delle particelle virali neoformate. In seguito ad un evento di frame shift ribosomiale che viene innescato a livello di un motivo che agisce in *cis* presente sull'RNA, si ha la formazione della poliproteina Gag-Pol (p160). Questo evento ha luogo solo nel 5% dei casi circa e questo spiega la presenza di Gag in un rapporto approssimativo di 20:1 rispetto al precursore Gag-Pol (Sundquist and Kräusslich, 2012).

Gli enzimi virali essenziali per il ciclo replicativo di HIV sono la proteasi (PR), l'integrasi (IN), l'RNasi H e la trascrittasi inversa (RT).

L'HIV **proteasi (PR)** si presenta sotto forma dimero e la sua azione si esplica con tagli proteolitici sulla poliproteina Gag-Pol e su Gag. Questi tagli sono essenziali per la corretta maturazione del virione (Sadiq et al. 2012).

La **trascrittasi inversa (RT)** è un eterodimero formato dalle due subunità p50 e p66 e presenta un'attività polimerasica RNA-dipendente: durante la retrotrascrizione, è in grado di produrre un doppio filamento di DNA a partire dallo stampo a RNA di concerto con l'**RNasi H** che degrada l'RNA template. Oltre all'azione dell'RT, sono necessari altri elementi per l'attivazione della trascrizione e la sintesi del DNA virale tra cui il TAR, una particolare struttura necessaria per il legame della proteina regolatrice Tat (Arnold and Sarafianos, 2008).

L'**integrasi (IN)** virale è essenziale per l'integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite. L'integrazione del provirus avviene in tre passaggi successivi: inizialmente l'attività esonucleasica dell'integrasi agisce tagliando il doppio filamento di HIV DNA; successivamente viene eseguito un taglio anche sul DNA della cellula ospite creando un sito per l'inserzione del genoma virale. Infine, l'attività ligasica dell'integrasi consente la formazione di legami covalenti alle estremità del DNA provirale permettendo integrazione del virus nel genoma dell'ospite (Bushman et al. 1990; Delelis et al. 2008). Questa integrazione non sembra essere strettamente determinata da specifiche sequenze ma piuttosto dallo stato della cromatina: regioni aperte e trascrizionalmente attive sembrano essere un bersaglio preferenziale per l'integrazione del provirus (Pryciak and Varmus, 1992).

Dal gene *env*, attraverso eventi di splicing, si genera la proteina **Env** o gp160 che successivamente formerà l'envelope virale. Env viene sintetizzata a livello del reticolo endoplasmico e successivamente migra nel Golgi dove viene glicosilata. Questo evento di glicosilazione è indispensabile per l'infettività del virus. Gp160 viene scissa da proteasi cellulare in due subunità: gp41 e gp120 che si vanno a localizzare sulla membrana della cellula infetta e, in seguito ad eventi di gemmazione, sull'envelope del virione, formando delle strutture caratteristiche note come *spikes*. Questi spikes sono trimeri composti da gp120, presente sulla superficie esterna del virus, e gp41 a localizzazione transmembranale. Gp120 lega uno specifico recettore presente sulle cellule bersaglio, il CD4 (Ward and Wilson, 2015). Inoltre possiede cinque regioni altamente conservate e cinque regioni ipervariabili. Tra queste regioni, V3 è particolarmente degna di nota in quanto la sua sequenza determina un tropismo preferenziale del virus per i linfociti T o la linea macrofagica. La regione V3 infatti è in grado di interagire con i co-recettori virali CCR5 e CXCR4 la cui variabilità di espressione nelle cellule bersaglio determina la loro suscettibilità a seconda del ceppo virale

con cui vengono a contatto. Gp41 invece, gioca un ruolo nella fusione del virus una volta che viene a contatto con la membrana cellulare permettendo il rilascio del contenuto della particella virale all'interno del citoplasma della cellula infettata (Arrildt et al. 2012).

Infine, sono presenti altri sei geni che codificano per altrettante proteine accessorie e regolatrici: *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* e *nef*. Tat e Rev sono considerate proteine regolatrici mentre le restanti 4 proteine vengono definite accessorie.

Tat (*Transactivator of Transcription*) viene tradotta a partire da un messaggero, formato da due esoni, che può subire diversi tipi di splicing a seconda che la trascrizione avvenga nelle fasi iniziali o nelle fasi finali del ciclo vitale del virus. Si possono trovare pertanto un mRNA che ha subito uno splicing completo oppure parziale che vengono rispettivamente tradotti in una proteina di 72 o 102 amminoacidi (Kuppuswamy et al, 1989). Entrambe le forme della proteina Tat si accumulano nel nucleo dove agiscono principalmente come transattivatori trascrizionali sull'RNA virale legandosi ad una sequenza presente al 5' terminale nota come TAR (*transactivation response element*). L'azione di Tat, in concomitanza con il legame di altri fattori, aumenta di fino a 1000 volte la trascrizione del genoma virale a livello dell'HIV LTR (Calnan et al. 1992; Edwards et al. 2005).

La peculiare struttura di Tat ne consente il coinvolgimento in diversi processi cellulari. La sua sequenza amminoacidica può essere suddivisa in sei regioni differenti: una iniziale ricca in proline e che contiene un Trp¹¹ altamente conservato; una regione II con una serie di cisteine altamente conservate e in grado di legare lo zinco (Egele' et al. 2008); una regione III che presenta anch'essa una sequenza conservata (⁴³LGISYG⁴⁸) assieme a una Phe³⁸; una regione IV ricca in residui basici dalle molteplici funzioni e una sequenza relativamente ben conservata (⁴⁹RKKRRQRRRAP⁵⁹); una regione V ricca in residui di glutamina e con una sequenza soggetta a una maggiore variabilità rispetto le precedenti; infine la regione VI al C-terminale, codificata dal secondo esone (Kuppuswamy et al, 1989). L'analisi della sua struttura ha mostrato come Tat sia una proteina molto flessibile e tendenzialmente disordinata (tanto che, in assenza dei suoi ligandi, è risultato molto difficile stabilire la sua conformazione) caratteristica che le consente di svolgere le sue molteplici funzioni.

La precisa localizzazione di Tat è ancora oggetto di studio; un'ipotesi accreditata è che i livelli di espressione di Tat ne influenzino la localizzazione e di conseguenza le funzioni. Alcuni studi hanno mostrato come, cellule infette o linee che esprimono Tat dove quindi la

concentrazione di Tat è piuttosto elevata, l'accumulo di Tat è maggiore a livello del nucleolo (Ruben et al. 1989; Kuppuswamy et al, 1989); mentre, cellule non infette da paziente HIV positivo in cui la presenza di Tat risulta essere molto scarsa, l'accumulo della proteina è più evidente a livello del nucleoplasma (Coiras et al. 2006). Evidenze riscontrate in pazienti con linfomi a cellule B associati ad infezione da HIV in cui è stata osservata una diffusa localizzazione a livello nucleare, sono a sostegno della teoria che la localizzazione di Tat sia guidata dalla sua concentrazione e che, proprio in virtù di questa diversa localizzazione, gli effetti che ne derivano possono essere molteplici. In particolare è stato osservato che gli effetti a livello nucleolare sono caratteristici delle cellule infette e/o che esprimono Tat e potrebbero non rispecchiare ciò che accade realmente in vivo. È stato però notato che la presenza di Tat a livello nucleare in cellule trasdotte in modo da esprimere alte concentrazioni di proteina, induce linfomagenesi attraverso la via trascrizionale e l'interazione con la cromatina e i suoi componenti; mentre la presenza di Tat nel nucleolo in pazienti HIV-infetti contribuisce alla replicazione e alla proliferazione cellulare (Lazzi et al. 2002).

La proteina viene rilasciata dalle cellule infette, raggiungendo livelli piuttosto elevati nel siero dei pazienti HIV positivi indipendentemente dall'efficacia della terapia antiretrovirale; inoltre è stata provata la sua presenza anche all'interno di cellule non infette.

La presenza di Tat a livello nucleare è vincolata dalla presenza di un dominio basico al quale si sovrappone una sequenza NoLS (nucleolar localization sequence) (Kuppuswamy et al. 1989). Esperimenti in vitro per chiarire se il transito di Tat nel nucleo avvenga mediante trasporto attivo o passivo hanno mostrato risultati contrastanti a seconda del modello utilizzato; pertanto il meccanismo resta ancora da elucidare. Inoltre, il dominio basico della proteina sembra essere in grado di legare sia la sequenza TAR svolgendo un ruolo critico nell'attivazione dell'espressione genica di HIV-1, che gli RNA cellulari. Recenti studi hanno infatti avanzato l'ipotesi che l'accumulo di Tat a livello nucleare possa essere guidato, più che dalla comune via mediata dalla sequenza NoLS, dalla capacità di Tat di legare elementi presenti a livello nucleare come gli RNA nucleari (Bowman et al. 2014).

È noto che la proteina Tat viene prodotta in quantità limitata anche nelle cellule infette latenti e questa piccola quota è sufficiente per innescare un feedback positivo che porta alla stimolazione della trascrizione virale. Tat è quindi in grado di reclutare la forma attiva di P-TEFb formato da Cdk9 e dalla ciclina T1 sull'elemento TAR dell'RNA virale formando quello

che viene definito il complesso terziario. A questo punto Cdk9 fosforila l'RNA polimerasi II rendendola un enzima altamente processivo in grado di trascrivere l'intero genoma virale (Van Lint et al. 2013; Mbonye and Karn, 2014). Inoltre, Tat può reclutare diversi enzimi e complessi in grado di modificare la struttura della cromatina, tra cui il complesso CBP/p300. Questo complesso agisce acetilando il promotore di HIV-1 cosicché questo non risulti più represso e rendendo l'RNA polimerasi II molto più processiva. Il complesso CBP/p300, interagendo con Tat, porta all'aumento della capacità di legame di diversi fattori di trascrizione tra cui la TATA-binding protein e il transcription factor IIB. Tat inoltre facilita la rimozione degli istoni H2A e H2B dal promotore di HIV promovendone la trascrizione. È stata descritta inoltre la presenza di due distinti complessi SWI/SNF nel corso del ciclo replicativo di HIV, BAF e PBAF. Mentre il primo viene rilasciato dal promotore di HIV una volta attivata la trascrizione, il secondo viene reclutato da Tat per facilitare la trascrizione (Marzio et al. 1998; Mahmoudi et al. 2006; Easley et al. 2010).

Per ciò che concerne la sua azione a livello citoplasmatico, studi in vitro e su ratti hanno mostrato che Tat può sia eccitare che portare alla morte i neuroni cerebrocorticali. Inoltre il secondo esone di Tat codifica per una sequenza amminoacidica piuttosto conservata che è in grado di legare i recettori dell'integrina interferendo con lo sviluppo fisiologico e la migrazione dei neuroni ed è coinvolto nel rimodellamento neuronale in seguito a traumi.

È stato osservato che Tat ostacola la riorganizzazione dell'actina che compone il citoscheletro cellulare interferendo con il traffico vescicolare durante l'esocitosi (Haughey et al. 2001; Nath et al. 2002; Tryoen-Toth et al. 2013).

È noto che questa proteina è in grado di attivare non solo geni di HIV ma anche modulare l'espressione di geni cellulari in modo da modificare l'ambiente cellulare rendendolo idoneo alla sopravvivenza e alla replicazione del virus. In vitro, è stato osservato che, a livello del nucleoplasma, Tat è in grado di interagire con diverse proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina tra cui la topoisomerasi II α , l'RNA elicasi A e le proteine MCM (minichromosome maintenance protein). Questi dati suggeriscono che, potenzialmente, Tat ha la capacità di agire sull'organizzazione strutturale della cromatina.

Infine, questa proteina è in grado di attivare l'enhancer di NF- κ B e reprimere l'espressione del gene c-Rel. La capacità attivare il pathway dell'apoptosi attraverso l'associazione di Tat con il promotore di PTEN e la subunità PPA2 potrebbe essere una spiegazione della via che porta alla morte dei linfociti T CD⁴ infetti (Dandekar et al. 2004; Gautier et al. 2009; Kim et al.

2010; Dhamija et al 2015). Concludendo, è evidente che Tat ha la capacità di interferire con importanti vie di segnalazione cellulare e svolge molteplici funzioni che interferiscono con le vie di segnalazione sia all'interno delle cellule infette che nelle cellule sane.

Rev è una proteina di circa 13 kDa composta da circa 116 amminoacidi che viene tradotta a partire da un messaggero che subisce eventi di splicing. L'N-terminale della proteina contiene due domini funzionali disposti in una configurazione elica-giro-elica: il segnale di localizzazione nucleare (NLS) e l'RNA binding domain (NLS/RBD) che contiene un motivo ricco in arginine (ARM), e il Rev multimerization domain ricco di residui idrofobici. Un terzo dominio al C-terminale presenta una configurazione più disordinata ma contiene una sequenza ricca in leucine nota come nuclear export signal (NES). Questo dominio effettore è essenziale per il reclutamento di Crm1 e altre proteine dell'ospite necessarie per l'esportazione del complesso Rev-RRE dal nucleo. Rev infatti crea interazioni Rev-Rev e Rev-RNA ed esplica la sua funzione di protezione dell'RNA virale legandosi all'elemento RRE presente sugli messaggeri virali che non subiscono splicing o che hanno subito un solo evento di splicing; una volta che Rev si lega all'RRE recluta Crm1 e altre proteine cellulari tra cui Ran-GTP formando un complesso che viene esportato al di fuori del nucleo. Una volta nel citoplasma, il complesso si dissocia e gli RNA integri vengono inclusi nei virioni nascenti oppure vengono tradotti nelle proteine strutturali virali e negli enzimi (Rausch and Grice, 2015).

Vpu, o viral protein U, è una proteina di transmembrana di tipo I di 88 amminoacidi. È formata quindi da un dominio N-terminale, un singolo dominio transmembrana e un C-terminale che sporge nel citosol. Vpu è tradotta a partire dal messaggero che contiene anche il gene *env* ed è prodotta in un secondo tempo durante il ciclo replicativo del virus. Una delle maggiori funzioni di Vpu consiste nel degradare le molecole recettoriali del CD4 neosintetizzate nel reticolo endoplasmatico e, insieme all'azione di Nef (che verrà approfondita successivamente) causano la downregolazione del recettore CD4 a livello della membrana cellulare della cellula infetta. Questo meccanismo fornisce una sorta di protezione al virus in quanto, la diminuzione dei complessi CD4-Env a livello della superficie cellulare, rende la cellula infetta meno riconoscibile e meno soggetta all'azione degli anticorpi che mediano la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) impedendone di fatto l'eliminazione da parte del sistema immunitario e contribuendo alla

propagazione del virus. Vpu è pertanto coinvolto nell'aumento del rilascio delle particelle virali modificando la composizione della membrana cellulare e rendendola più ottimale alle necessità del ciclo replicativo di HIV-1. BST2 (Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2) è un fattore di restrizione che ancora le particelle virali impedendone il rilascio. Vpu antagonizza l'azione di BST2 causando la degradazione di questo fattore di restrizione e aumentando pertanto il rilascio della progenie virale. Infine, è stato ipotizzato che Vpu causi cambiamenti, e in particolare depolarizzazioni, a livello del potenziale della membrana cellulare favorendo il rilascio del virus (Gonzales, 2015).

La proteina **Nef**, negative regulatory factor, è una proteina di 27-35 kDa miristilata nella regione N-terminale. Questa modificazione le consente di associarsi con il lato citosolico della membrana cellulare e svolgere molte delle sue funzioni. Nef esplica le sue funzioni modulando l'espressione di diverse proteine di superficie e tra queste, degne di nota sono la downregolazione del recettore CD4 attraverso la sua degradazione a livello della membrana cellulare delle cellule infette, e del complesso di istocompatibilità MHC-I, interferendo con il riconoscimento e la distruzione delle cellule infette da parte dei linfociti T citotossici (Pereira and daSilva, 2016).

Vif (viral infectivity factor) è una proteina di 23 kDa prodotta durante le fasi finali del ciclo replicativo del virus. Questa proteina risulta essere cruciale per la replicazione di HIV-1 in cellule non permissive tra cui i linfociti, i macrofagi e alcune linee cellulari a cellule T. È stato dimostrato inoltre che Vif è in grado di bloccare l'azione di un'importante fattore di restrizione cellulare che fa parte dell'immunità innata a protezione dalle infezioni dei retrovirus: APOBEC3G, una citidina deamminasi che causa ipermutazioni letali durante la sintesi del cDNA da parte dell'RT sia in HIV-1 che in altri retrovirus. Inoltre, Vif gioca un ruolo cruciale anche nell'assemblaggio della particella virale, favorendo riarrangiamenti conformazionali del core del virus (Batisse et al. 2012).

Infine **Vpr** (viral protein R) è una proteina di circa 13 kDa altamente conservata che media diversi processi durante il ciclo replicativo di HIV. Tra questi, di notevole rilevanza sono l'arresto del ciclo replicativo della cellula in G₂, l'importazione a livello nucleare del complesso virale PIC (preintegration complex), la modulazione dell'apoptosi dei linfociti T, l'attivazione trascrizionale dei geni cellulari e virali attraverso il promotore 1-LTR di HIV e la regolazione dell'attività di NF-κB (Zhao et al. 2011; Kogan and rappaport, 2011).

1.1.5 CICLO REPLICATIVO

Il ciclo replicativo di HIV può essere diviso in due fasi principali: una fase precoce che porta all'instaurarsi dell'infezione e prevede il legame del virus con la cellula bersaglio, l'entrata all'interno della cellula stessa, la liberazione (*uncoating*) del capsido virale associato alla retrotrascrizione del genoma virale in DNA; quest'ultimo viene poi importato all'interno del nucleo cellulare dove può avvenire l'integrazione nel genoma dell'ospite. La fase tardiva invece comprende gli eventi che vanno dall'espressione dei geni di HIV, all'assemblaggio, fino al rilascio del virione maturo. Questa fase è strettamente vincolata dallo stato di attivazione della cellula.

In un primo momento, il legame di HIV alla cellula bersaglio può essere guidato da interazioni relativamente non specifiche, con Env che interagisce con gli eparan solfati presenti sulla membrana cellulare, oppure da interazioni più specifiche tra Env e l'integrina $\alpha 5\beta 7$ o altre vie di segnalazione che coinvolgono il riconoscimento recettoriale come il DC-SIGN. L'ancoraggio di HIV alla cellula bersaglio, porta il virus a una distanza tale per cui possono entrare in gioco legami molto più forti e specifici. A questo punto, Env è in grado di interagire con il recettore più importante coinvolto nell'infezione: il recettore CD4 presente sulla cellula ospite, normalmente deputato ad amplificare il segnale della via di segnalazione mediata dal T-cell receptor (TCR). Come già accennato, Env è formato da eterodimeri delle proteine gp120 e gp41. La prima è responsabile del legame al recettore presente sulla superficie cellulare ed è formata da 5 domini relativamente conservati (C1-C5) e da 5 regioni variabili (V1-V5). Il legame con CD4 provoca riarrangiamenti a livello di V1/V2 e successivamente di V3. Contemporaneamente si forma una struttura chiamata *bridging sheet* che, insieme al riposizionamento di V3, rappresenta uno dei passaggi critici per l'entrata del virus in quanto porta al legame con i corecettori di HIV, CXCR4 e CCR5. Questi corecettori sono rappresentati da recettori delle chemochine e sono essenziali per aumentare l'efficienza di entrata del virus oltre che a definirne il tropismo (fig. 4).

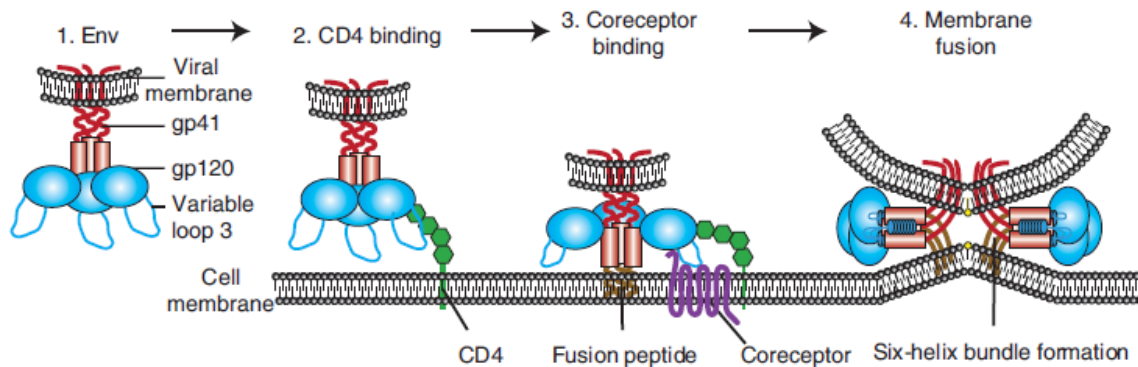


Figura 4. Fasi del legame del virus con la cellula bersaglio (Wilén et al. 2012).

I diversi ceppi virali di HIV possono avere maggiore affinità (dettata da V3) per il corecettore CXCR4 presente soprattutto nei linfociti, ed in questo caso il ceppo viene definito X4 HIV; o per il corecettore CCR5 presente sui macrofagi, e in questo caso il ceppo viene definito R5 HIV, oppure per entrambi e in questo caso viene chiamato X4R5 HIV. È stato osservato che nelle prime fasi di infezione, nonostante gli alti livelli di CXCR4 espressi dalle cellule bersaglio circolanti, si assiste più frequentemente alla circolazione di virus R5-tropico che viene sostituito gradualmente da virus X4R5 e/o X4 quando l'infezione diventa pregressa (Arrildt et al. 2012). L'importanza dei corecettori è sostenuta dalla scoperta che, una delezione di 32bp nel gene *ccr5* nota come *ccr5Δ32*, causa un codone di stop prematuro e risulta nella formazione di una proteina mutata che non viene riconosciuta dai ceppi virali a tropismo macrofagico. Quando presente in omozigosi, i soggetti sono resistenti all'infezione con ceppi R5 (ma non con X4) e in eterozigosi conferisce una resistenza parziale e una progressione della malattia più lenta.

Il virus, una volta saldamente ancorato alla cellula, migra sulla superficie verso regioni più favorevoli alla fusione con la membrana cellulare. La fusione prevede l'esposizione del peptide di fusione idrofobico gp41 che si inserisce nella membrana cellulare formando un poro di fusione consentendo così l'endocitosi della particella virale (fig. 4). La capacità di HIV di muoversi sulla superficie cellulare ha diversi vantaggi: innanzitutto gli consente di spostarsi verso regioni in cui sono espressi livelli più alti di corecettore o di molecole che fanno parte di vie di segnalazioni importanti per le fasi successive dell'infezione, oppure può fare in modo che la fusione avvenga in prossimità del nucleo che rappresenta poi l'obiettivo finale di HIV.

Durante l'infezione per contatto cellula-cellula la situazione è lievemente differente. Per esempio, le cellule dendritiche (DCs) sono cellule deputate alla presentazione dell'antigene (antigen presenting cells, APCs). Queste cellule sono relativamente resistenti all'infezione produttiva, tuttavia, proprio per le loro funzioni, esprimono una serie di fattori volti all'internalizzazione e al processamento dei patogeni. HIV può sfruttare questo meccanismo per diffondersi ulteriormente durante la presentazione dell'antigene alle cellule T. Diversi studi hanno dimostrato la formazione di quella che viene chiamata sinapsi infettiva. Una volta internalizzato nelle DCs, il virus non viene degradato e, quando la DC infetta incontra una cellula T sana, HIV migra nell'interfaccia tra la cellula T e la DC. Qui la particella virale incontra la cellula T all'interno di quella che viene definita sinapsi infettiva. Questa sinapsi, oltre a presentare HIV, contiene anche alte concentrazioni di recettori e corecettori che sono stati appositamente reclutati.

È stato osservato che le DCs possono estendere delle protrusioni che racchiudono e inglobano l'ambiente extracellulare intrappolando i virioni in un ambiente relativamente protetto ma allo stesso tempo accessibile. Quando la DC incontra una cellula T, questa estende filopodi all'interno del compartimento creato contenente il virus ancorato.

Di fatto perciò, l'ancoraggio efficiente di HIV dovuto alle funzioni fisiologiche svolte dalla DC, l'incontro specifico con la cellula T CD4⁺, e la rilocalizzazione dei recettori e corecettori, rendono la sinapsi infettiva un luogo altamente favorevole per la disseminazione di HIV (Wilensky et al. 2012).

Una volta nel citoplasma, all'interno del core virale ha inizio la retrotrascrizione del genoma di HIV ad opera dell'enzima RT del virus e la formazione di un doppio filamento di DNA. Il processo ha inizio con l'annealing di un tRNA_{Lys} presente all'interno del core con il primer binding site (PBS) al 5' del genoma. Mentre la replicazione procede attraverso la regione 5'R, l'RNasi H degrada l'RNA appena retrotrascritto. Al termine della regione 5'R l'enzima compie una sorta di "salto" sfruttando le analogie di sequenza e si colloca, assieme al filamento di DNA in formazione, nella regione 3'R dove riprende la sua attività di sintesi (Ferguson et al. 2002).

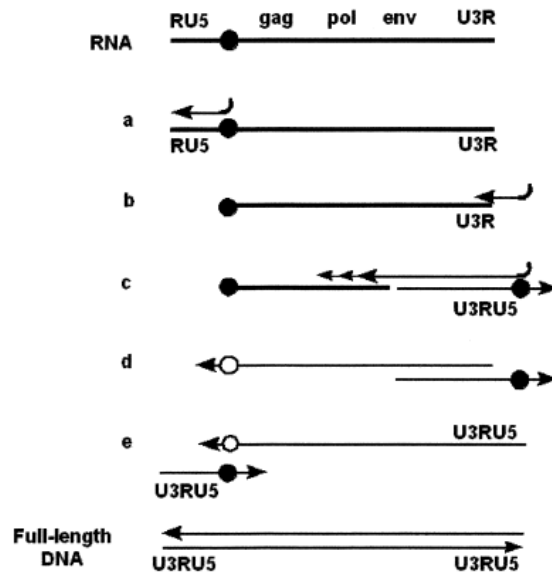


Figura 5. Retrotrascrizione del filamento di RNA di HIV (Ferguson et al, 2002).

Studi recenti hanno proposto che l'uncoating virale, ovvero la liberazione del virione dalle proteine strutturali, non avvenga all'inizio della retrotrascrizione ma dopo il trasferimento del primo filamento ssDNA sintetizzato (Mamede et al. 2017). Nel frattempo l'attività RNAsica degrada l'RNA genomico dell'ibrido DNA/RNA lasciando libero il 3' del DNA neosintetizzato che viene usato come primer per la sintesi del filamento a polarità positiva (fig. 5). Allo stesso modo, il completamento del secondo ssDNA avviene in seguito al trasferimento del filamento neoformato per permetterne la sintesi completa. In questo modo, il dsDNA contiene alle sue estremità le regioni U3RU5 (che compongono le regioni LTRs) le quali sono indispensabili nelle fasi successive del ciclo replicativo. La grandissima variabilità genetica del virus è imputabile principalmente a due meccanismi: l'introduzione di mutazioni come risultato dell'introduzione erronea di nucleotidi a causa dell'elevato tasso di errore dell'enzima RT e la ricombinazione che può avvenire durante il trasferimento dei filamenti template nel il processo di retrotrascrizione (Hu and Hughes, 2012).

Una volta completato il processo di retrotrascrizione, il complesso di pre-integrazione (PIC) viene trasportato attivamente nel nucleo cellulare. Una volta nel nucleo, il DNA di HIV può andare incontro a integrazione nel genoma cellulare dove rimane per tutta la durata della vita della cellula e della sua progenie, oppure può andare incontro a reazioni di circolarizzazione. Esistono due forme circolari: 1-LTR che si crea in seguito a eventi di ricombinazione che hanno luogo all'interno del nucleo tra le regioni LTRs (fig.6) oppure

come conseguenza allo stallo dell'RT che non riesce a terminare correttamente il processo di trasferimento del filamento in fase di sintesi. 2-LTR invece si forma in seguito alla ligazione delle estremità dell'HIV DNA (fig. 6) (Ferguson et al, 2002). È stato dimostrato che queste forme sono comunque in grado di portare all'espressione di geni virali (Cara et al. 1996, Wu et al. 2001). Nel caso in cui il DNA vada incontro ad integrazione, è stato osservato che questa non avviene in prossimità o all'interno di geni o sequenze preferenziali. HIV tende ad integrare il proprio genoma all'interno di regioni che sono attivamente trascritte.

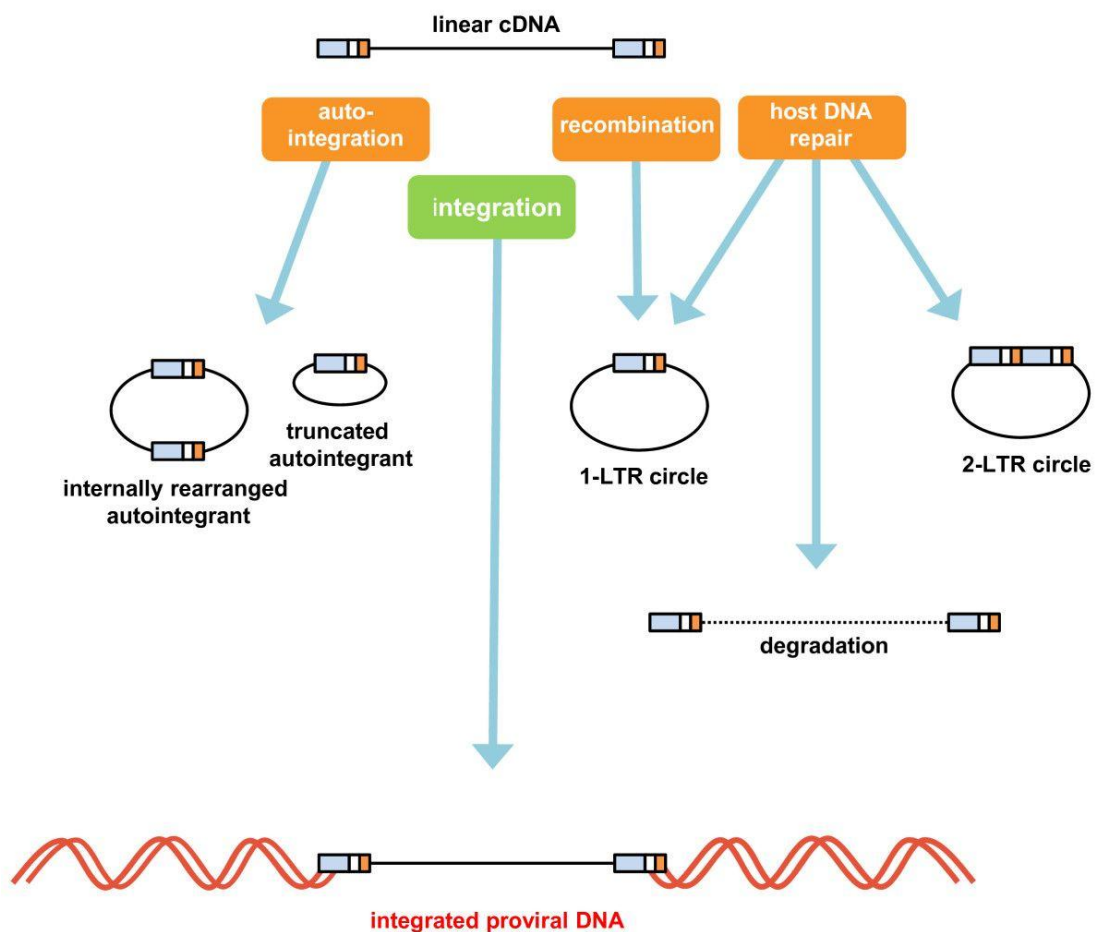


Figura 6. Rappresentazione delle diverse forme di HIV DNA (Sloan, Wainberg 2011).

Questo processo prevede il taglio da parte dell'enzima IN delle estremità del genoma virale e la produzione di un taglio analogo sul genoma cellulare. A questo punto il filamento di DNA si inserisce all'interno del taglio prodotto su un cromosoma dell'ospite e, mediante ligazione, le estremità vengono unite. Si ha così la formazione del provirus che può essere attivamente trascritto assieme ai geni cellulari. Nel caso in cui la cellula entri in uno stato di quiescenza, il provirus può andare in latenza con essa. I motivi della latenza virale possono essere

molteplici e verranno trattati successivamente. Pool di cellule latenti infette vanno a formare quello che viene definito *reservoir* virale (Craigie and Bushman, 2012).

La fase tardiva del ciclo replicativo di HIV inizia con l'espressione dei geni virali e richiede la cooperazione sia di fattori virali che di fattori cellulari. Il segnale di inizio trascrizione si trova nella regione 5'LTR; tutti i trascritti sono sotto il controllo di un promotore di per sé piuttosto debole. Esiste però una serie di elementi volti ad aumentare l'efficacia della trascrizione. Per quanto riguarda il legame della RNA polimerasi II, questo viene rafforzato dalla presenza di una TATA box dove si può legare il fattore di trascrizione IID (TFIID) e tre siti di legame per i fattori Sp1 e NF-κB, essenziali per la replicazione virale. Inoltre, un ulteriore incremento della sintesi dell'RNA è data dal legame della proteina Tat all'elemento TAR presente in tutti gli RNA virali. Tat è in grado di reclutare il complesso P-TEFb che comprende la Cdk9 e la ciclina T1. Questo complesso fosforila l'RNA polimerasi II nel suo dominio C-terminale rendendo l'enzima più processivo.

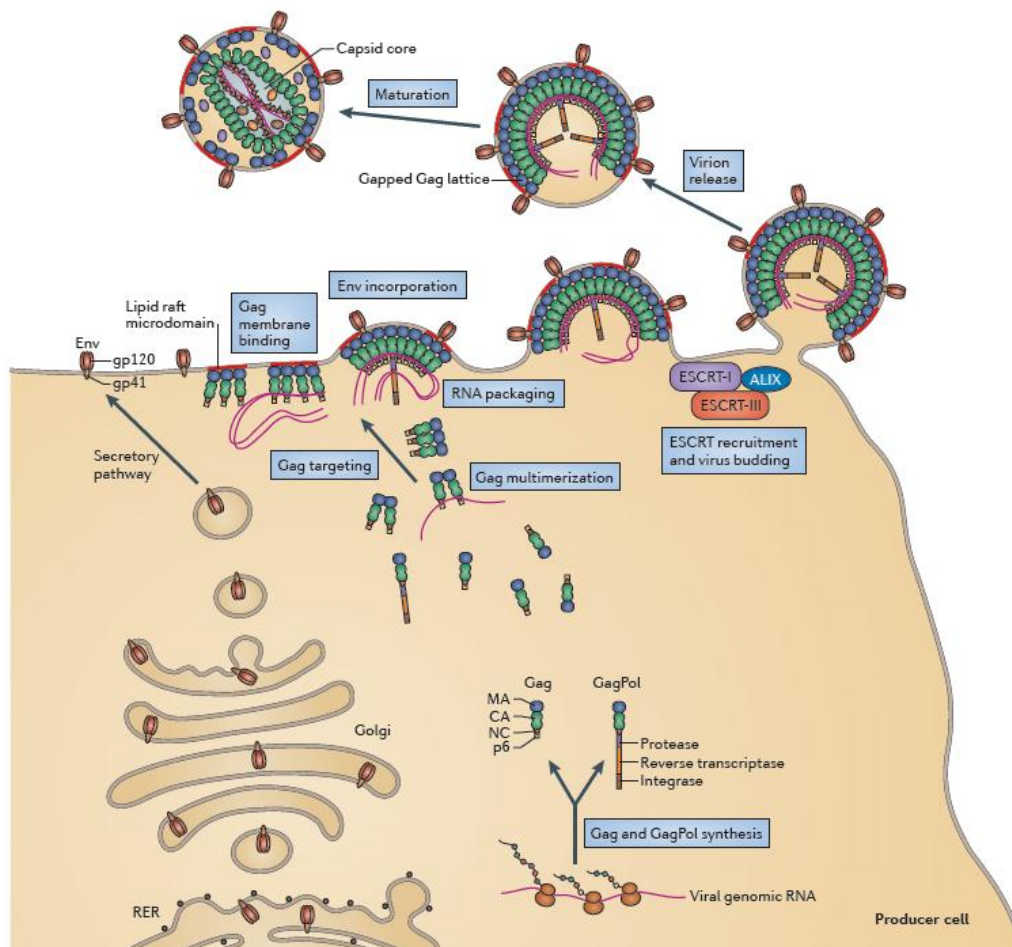


Figura 7. Ciclo replicativo di HIV dall'assemblaggio alla maturazione delle particelle virali (Freed 2015).

I messaggeri che si formano nelle fasi iniziali, tat, nef e rev, vanno incontro ad eventi di splicing completo che avvengono prima che questi mRNAs vengano esportati dal nucleo. Le fasi successive sono caratterizzate dalla presenza dei messaggeri che subiscono splicing parziale (env, vif vif e nef) e quelli non sottoposti a splicing (Gag, Gag-Pol e il materiale genetico per i nuovi virioni che si formeranno). Questa sequenza di eventi è guidata dalla proteina Rev che regola la proporzione tra i messaggeri che subiscono splicing e quelli che non lo subiscono. Questa proteina, infatti, si sposta continuamente tra il nucleo e il citosol promuovendo l'esportazione nucleare dei messaggeri virali. Ciò è dovuto alla sua capacità di legare l'elemento RRE presente sugli mRNA virali seguito dalla formazione di un complesso per l'esportazione composto dal fattore di esportazione nucleare Crm1 (o EXP1) e dalla GTPasi Ran. Una volta nel citoplasma i messaggeri vanno incontro a due processi: la

traduzione in proteine virali e l'assemblaggio nella nuova particella virale (fig. 7) (Sundquist and Kräusslich, 2012).

L'assemblaggio inizia con la sintesi della poliproteina Gag e la sua migrazione verso il foglietto interno della membrana plasmatica regolata dal fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato. La dimerizzazione dell'RNA può avvenire sia a livello della membrana cellulare che nel citosol ed è uno dei segnali di riconoscimento per l'assemblaggio del virione. Gag è il protagonista principale che guida l'incapsidazione dell'RNA attraverso il dominio NC. NC funge da chaperone incorporando contemporaneamente anche i tRNA_{Lys} e l'enzima RT. Gag è in grado sia di legare l'RNA a livello dell'elemento PSI al 5'UTR e dell'elemento RRE (solitamente avviene nel citosol) oppure, se avviene a livello della membrana plasmatica o del virione in assemblamento, la proteina forma dei crosslink in diversi siti sparsi per il genoma virale. Nonostante la dimerizzazione dell'RNA sia un segnale che contribuisce ad innescare l'assemblaggio del virione, l'attore più importante che scatena la multimerizzazione di Gag è il dominio CA. Nella particella virale immatura, le molecole di Gag si allineano rapidamente ancorando il dominio MA al foglietto interno della membrana cellulare mentre il C-terminale è orientato verso il centro della particella.

Il meccanismo che porta all'incorporazione di Env invece non è stato ancora completamente chiarito. Env viene inserita co-traduzionalmente nel lume del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e trasportata sulla superficie cellulare per via secretoria. Sembra che il dominio MA di Gag e la coda citoplasmatica di gp41 di Env interagiscano e siano coinvolte nell'incorporazione di Env nella particella virale.

Una volta assemblata, la particella nascente subisce un evento di fissione che la porta a staccarsi dalla cellula infettata. In seguito al rilascio, il virione subisce ulteriori tagli proteolitici che portano alla definitiva maturazione del virus.

Il meccanismo che porta al rilascio del virus è guidato dalla presenza, in diverse regioni della poliproteina Gag, di motivi definiti *late domains*. Questi domini sono composti da tre diverse sequenze: il motivo PTAP, PPXY e YPXL. La presenza di questi motivi recluta il macchinario cellulare ESCRT composto da diversi complessi multiproteici e fattori accessori che vanno a restringere la "protrusione" del virione nascente provocando una strozzatura che porta al rilascio del virione immaturo dalla cellula infetta per gemmazione.

La maturazione finale avviene ad opera di proteasi virali che vengono incorporate nel virus come parte del precursore GagPol. La proteasi taglia diversi siti sia su Gag che su GagPol causando un importante cambiamento a livello della morfologia del virus: mentre nel virus immaturo Gag è disposta in modo radiale, i tagli proteolitici liberano Gag consentendo alla proteina CA di disporsi in modo che core del capside virale assuma la consueta forma conica dando vita a una particella virale matura (fig. 2) (Freed 2015).

1.2 PATOGENESI DI HIV

In assenza di terapia, l'infezione da HIV ha un andamento tipico che, nel 95% dei casi, porta alla morte del paziente. Il decorso dell'infezione viene suddiviso in due fasi principali: infezione primaria, che va dall'infezione allo sviluppo di una reazione anticorpale (sieroconversione) evidenziabile con i test di screening della routine diagnostica; e infezione tardiva, che comprende il periodo della latenza clinica dovuto ad una sorta di equilibrio tra la replicazione virale e la risposta anticorpale del soggetto HIV positivo. In assenza di terapia nella fase terminale di AIDS conclamato, la risposta immunitaria del paziente non riesce più a contenere il virus e questo porta rapidamente alla morte della persona.

Quando un virione infetta la cellula bersaglio, nelle prime settimane (1-2 settimane) il virus è in grado di replicarsi in modo incontrollato e disseminarsi in diversi tessuti ed organi. In questa fase, definita "periodo finestra", la viremia non è ancora rilevabile, la risposta immunitaria non è ancora presente e il paziente non mostra segni clinici.

Attorno alla 2-4 settimana, ha inizio la fase acuta, o infezione primaria, in cui si assiste ad un rapido aumento della viremia plasmatica (fino a 10^7 copie di RNA virale/ml) e all'espansione del numero di linfociti T CD4⁺ infettati nel sangue e nei linfonodi. In alcuni casi, si può assistere ad una sintomatologia simil-febbrile. La risposta immunitaria inizia ad apparire più o meno in concomitanza con il picco della viremia ed è rappresentata sia da anticorpi contro le proteine virali che dalla risposta dei linfociti T CD8⁺ contro gli antigeni espressi dalle cellule infette (fig. 8). Il picco di viremia presumibilmente è dovuto ad una combinazione di fattori: sia all'assenza di una risposta immunitaria precoce, che alla presenza di un numero elevato di linfociti T CD4⁺ attivati come reazione del sistema immunitario, che rappresentano però uno dei target d'elezione del virus.

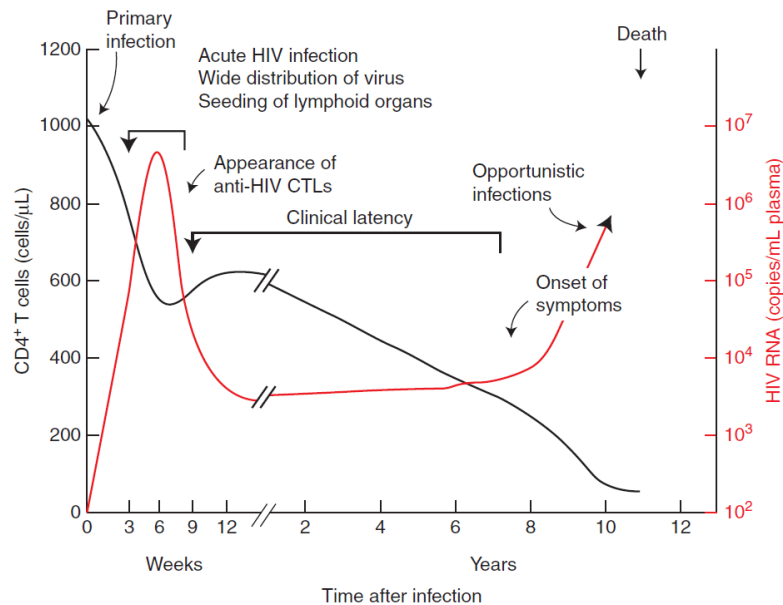


Figura 8. Evoluzione dell'andamento delle cellule T CD4⁺ e della viremia plasmatica durante l'infezione da HIV (Coffin, Swanstorm 2013).

Al termine della fase acuta la viremia cala drasticamente sia grazie al sistema immunitario che riesce parzialmente a controllare all'infezione, sia per l'esaurimento del target linfocitario dato dai linfociti T CD4⁺. Per quanto riguarda l'andamento di queste cellule, inizialmente si assiste ad un rapido calo che termina quasi in concomitanza con il picco di viremia (fig. 8) al quale segue una lieve ripresa.

L'infezione cronica, o fase di latenza clinica (1-20 anni), inizia con una lieve ripresa dei linfociti T CD4⁺ seguita da un lento e costante declino associato ad un costante aumento della viremia plasmatica (fig. 8). In questa fase normalmente il paziente non è cosciente di essere infetto in quanto i linfociti T CD4⁺ sono ancora in un numero tale da consentire una risposta immunitaria efficace contro altri patogeni. La produzione di anticorpi neutralizzanti inizia circa dopo tre mesi dall'instaurarsi dell'infezione ma, a causa della capacità del virus di mutare ed evadere la sorveglianza data dal sistema immunitario, nel tempo la loro presenza non porta benefici al paziente (Fauci and Desrosiers 1997; Maartens et al. 2014).

La fase terminale invece è caratterizzata dalla comparsa dell'AIDS conclamato. In questa fase si assiste ad un declino delle cellule T CD4⁺ al di sotto delle 200 cellule/μl (fig. 8). Il sistema immunitario non è più in grado di gestire la presenza di patogeni e compaiono infezioni da

parte di patogeni opportunisti. La viremia riprende a crescere e questa fase culmina con la morte del paziente (Coffin, Swanstorm 2013).

È stato ipotizzato, ed è ormai riconosciuto, che il target iniziale del virus è rappresentato da una cellula T CD4⁺ di memoria che esprime il corecettore CCR5. Queste cellule sono molto abbondanti soprattutto nella lamina propria di tutte le mucose e proprio per questo sono un facile e diffuso bersaglio per HIV. La replicazione virale a livello delle mucose è ritenuto uno dei passaggi fondamentali sia per la trasmissione dell'infezione che per le fasi iniziali della replicazione e amplificazione di HIV, prima che quest'ultimo entri in circolo. Non a caso, la maggior parte dei linfociti T CD4⁺ nel sistema immunitario mucosale sono cellule di memoria attivate che esprimono quindi livelli elevati di CCR5 rispetto per esempio ai linfociti T CD4⁺ naïve che invece esprimono il corecettore CXCR4. È stato osservato che l'espressione del CCR5 risulta aumentata durante l'infezione e con l'attivazione immunitaria, mentre il CXCR4 risulta diminuito. Inoltre è stato osservato che cellule T CD4⁺, nonostante non esprimano marker di attivazione di superficie, sono comunque in grado di supportare livelli significativi di infezione, soprattutto nella mucosa intestinale.

Nonostante i linfociti T CD4⁺ siano uno dei target d'elezione per il virus, anche i linfociti T CD8⁺ sono bersaglio di HIV assieme alle cellule natural killer (NK) e le cellule DCs il cui ruolo nella disseminazione dell'infezione con la formazione della sinapsi infettiva è già stato precedentemente descritto. Infine è stato osservato che il virus è in grado di infettare anche i monociti. Questi possono successivamente migrare nei tessuti e differenziare in macrofagi. A livello del sistema nervoso centrale è stata evidenziata la presenza di ceppi di HIV a tropismo macrofagico; due sono i possibili target cellulari in questa area: le cellule della microglia e i macrofagi perivascolari che sono in grado di migrare nel cervello (Lackner et al. 2012; Swanstorm and Coffin, 2012).

Il coinvolgimento di diverse popolazioni che fanno parte del sistema immunitario presenta importanti ulteriori conseguenze oltre alla disseminazione massiva del virus. In aggiunta alla perdita massiva di cellule T CD4⁺, si assiste anche a una diminuzione dei linfociti T-helper 17 cruciali nella difesa contro i batteri e ad una significativa deplezione delle cellule T CD4 e CD8 naïve. Da non sottovalutare è anche l'attivazione cronica del sistema immunitario associata all'infezione da HIV che coinvolge sia l'immunità innata che l'adattativa e causa nell'organismo del paziente uno stato di infiammazione cronica. Questa attivazione, che ha

ripercussioni anche a livello di altri sistemi e apparati, è scatenata da diversi fattori tra cui, per via diretta, anche da HIV che può fungere da ligando del Toll-like receptor (TLR7 e 8) espresso sulle DC e porta alla produzione di INF- α ; inoltre, la diminuzione delle cellule linfocitarie nel tratto gastrointestinale associata con l'apoptosi degli enterociti e l'aumento di permeabilità del tratto gastrointestinale stesso porta a un aumento della concentrazione di prodotti microbici come lipopolisaccaridi nel plasma. Questi lipopolisaccaridi vanno a stimolare una produzione anomala e cronica di citochine proinfiammatorie come IL-6 e TNF- α . È noto che la terapia antiretrovirale, per quanto riesca a ridurre questa attivazione persistente e di conseguenza questo stato di infiammazione cronica, non è in grado di bloccarla, probabilmente a causa di bassi livelli di replicazione virale residui che la terapia non è in grado di debellare (Maartens et al. 2014).

1.2.1 DIAGNOSI VIROLOGICA E IMMUNOLOGICA

La diagnosi di infezione da HIV viene eseguita attraverso una serie di test sempre più specifici. I test di screening o di primo livello raccomandati dalle linee guida italiane sono degli *immuno-assay* di quarta generazione basati sulla rilevazione degli antigeni e degli anticorpi. Questa combinazione consente di rilevare l'infezione anche quando gli anticorpi non sono presenti o perché ci si trova nel periodo finestra in cui la risposta anticorpale non è ancora stata prodotta, o perché lo stato di immunodepressione del paziente è tale da essere associato a perdita di anticorpi. La positività di questo test o il risultato dubbio devono essere accertati da un test di conferma (westernblot). In caso di positività o di risultato dubbio, è necessaria un'ulteriore conferma con la ricerca ed eventuale quantificazione della viremia plasmatica con un Real Time qRT-PCR (Linee Guida Italiane, 2017). Recentemente è stato proposto una nuova metodica non ancora standardizzata per la stadiazione dell'infezione: il test di avidità. Questo test permette di discriminare tra infezioni recenti (meno di 6 mesi dal presunto contagio) e infezioni pregresse (più di 6 mesi dal presunto contagio) aiutando a chiarire l'arco di tempo in cui è avvenuta l'infezione e consentendo di individuare eventuali partner a rischio. Gli ultimi dati disponibili relativi la regione Emilia Romagna mostrano che, tra le nuove infezioni certificate da maggio 2013 a maggio 2016 nei centri che hanno aderito allo studio, circa il 18,7% erano infezioni recenti mentre l'81,7% erano infezioni croniche (Musumeci et al, 2016). L'importanza di poter diagnosticare

tempestivamente l'infezione da HIV possibilmente proprio nelle prime fasi verrà discussa e approfondita nei prossimi paragrafi.

Al paziente a cui viene diagnosticata una nuova infezione viene consigliato di iniziare nel minore tempo possibile la terapia antiretrovirale così da ridurre la viremia plasmatica (e quindi il rischio di ulteriore diffusione del virus). Contemporaneamente vengono eseguiti test di resistenza per individuare eventuali resistenze pregresse ai farmaci antiretrovirali ed poter fornire al paziente una terapia antiretrovirale (ART, antiretroviral therapy) idonea ed efficace.

La diagnosi immunologica invece è rappresentata dalla conta dei linfociti T CD4⁺ che rappresenta un marcatore immunologico prognostico importante. È stato osservato che la progressione clinica dell'infezione da HIV è associata a basse conte percentuali di T CD4⁺. Inoltre il recupero del numero dei linfociti T CD4⁺ dopo l'inizio della terapia è risultato essere fortemente associato al loro valore al nadir, all'età del paziente ed a eventuali coinfezioni (Mocroft et al. 2010).

Infine, un ultimo parametro sempre più di rilievo, in associazione alla conta sia percentuale che assoluta dei T CD4⁺, è il rapporto tra i linfociti T CD4⁺/CD8⁺. Questo valore ha un significato importante in quanto indicatore del grado di funzionalità del sistema immunitario. Prima dell'inizio della ART, i pazienti HIV positivi presentano un'inversione di questo rapporto che solo in pochi casi riesce ad essere recuperato con l'inizio della terapia (Linee Guida Italiane, 2017; Ledergerber et al. 2004; Serrano-Villar et al. 2014; Mussini et al. 2008).

Esistono poi due categorie di pazienti in cui l'infezione segue un decorso atipico rispetto al normale andamento in assenza di terapia: gli elite controllers ed i post-treatment controllers. Questi pazienti presentano una maggiore capacità di controllare il virus ma i meccanismi che stanno alla base di questo controllo non sono stati ancora del tutto chiariti. La prima categoria di pazienti, gli *elite controllers*, sono in grado di controllare la viremia per periodi estremamente prolungati in completa assenza di terapia (Bon et al. 2015). Rappresentano meno dell'1% della popolazione infetta e sono caratterizzati da una conta elevata di linfociti T CD4⁺ e una progressione molto lenta dell'infezione. Come già accennato, presentano una viremia plasmatica al di sotto dei limiti di rilevazione dei test utilizzati nei

controlli di routine pur non assumendo ART ma con valori rilevabili di cell-associated RNA e DNA provirale. Pur essendo un gruppo piuttosto eterogeneo di persone, sono stati individuati alcuni parametri genetici e immunologici comuni: innanzitutto, la maggior parte di questi pazienti esprime alleli protettivi HLA (HLA-B*57, HLA-B*27 e HLA-B*5801); inoltre, tra gli elite controllers che presentano una risposta specifica delle cellule T CD8⁺, la risposta contro Gag è predominante e presentano cellule T CD8⁺ polifunzionali (Okulicz and Lambotte 2011; Lackner et al. 2012). I *post-treatment controllers* (PTCs) sono una categoria leggermente diversa dagli elite controllers, sia dal punto di vista genetico che immunologico. Normalmente questi pazienti hanno avuto la diagnosi di infezione quando quest'ultima era ancora in fase acuta e hanno assunto la terapia antiretrovirale per alcuni anni (mediamente 3 o 4 anni). In seguito ad interruzione di terapia, sono stati in grado di mantenere la viremia plasmatica al di sotto dei limiti di rilevazione dei test commerciali per le analisi di routine per diversi anni prima di sperimentare il rebound virale. Questi pazienti presentano alti livelli di viremia e una sintomatologia acuta legata all'infezione che contribuisce ad una diagnosi precoce nella maggior parte dei casi. Non presentano nessuno degli alleli protettivi HLA di classe I frequenti negli elite controllers; l'unico allele che appare particolarmente rappresentato nei PTCs è HLA-B*35, associato ad una progressione più rapida della malattia. Nonostante ciò, sembra anche influire sull'attività di alcune popolazioni cellulari del sistema immunitario consentendo una maggiore capacità di controllo del virus e, in conclusione, risultando vantaggioso per il paziente. Anche la risposta dei linfociti T CD8⁺ HIV-specifica e la loro stessa attivazione sembra più debole in questa popolazione di pazienti rispetto agli elite controllers. Studi recenti, però, hanno mostrato nelle cellule NK dei PTCs un'alta espressione di specifici recettori immunoglobulin-like, i KIRs. In particolare uno di loro, KIR3DL1, è associato con il rallentamento nella progressione della malattia. Infine le loro cellule NK sembrano produrre maggiori quantità di INF- γ aumentando la loro capacità di controllare HIV (Cockerham et al. 2016).

1.3 TERAPIA ANTIRETROVIRALE

L'avvento della terapia antiretrovirale ha rivoluzionato la qualità e l'aspettativa di vita dei pazienti HIV positivi e la visione della malattia stessa. Si è passati dal dover affrontare una malattia che nella quasi totalità dei casi portava a morte certa in pochi anni, a dover

affrontare un'infezione dall'andamento cronico. Nonostante ciò, la ART non è una terapia curativa; in seguito ad interruzione normalmente si assiste ad un rebound virale nel giro di poche settimane. Se somministrata e assunta in modo appropriato tuttavia, la ART è estremamente efficace: nella maggior parte dei casi è in grado di ridurre e rendere non rilevabile la viremia plasmatica (intesa come al di sotto dei limiti di rilevazione dei kit utilizzati nella routine diagnostica) oltre che migliorare la funzionalità del sistema immunitario, ridurre l'infiammazione cronica e diminuire il rischio di sviluppare AIDS (Davey et al. 1999; Deeks et al. 2015). In alcuni casi, nonostante l'assunzione della terapia antiretrovirale, alcuni pazienti sviluppano varianti virali resistenti ai farmaci. L'insorgenza di resistenza ai farmaci è uno dei maggiori problemi nel campo dell'HIV. Infine, nonostante i notevoli vantaggi dati dalla terapia antiretrovirale, la sua tossicità è ampiamente documentata. Non tutti i farmaci hanno lo stesso grado di tossicità e gli stessi effetti collaterali ma le comorbidità associate ad HIV sono un campo molto attivo di ricerca. Sono note per esempio le complicanze in ambito cardiovascolare, quelle associate al sistema nervoso, al fegato, ai reni, oppure il coinvolgimento del tessuto osseo o il rischio di insorgenza di diabete mellito (Rodriguez-Penney et al. 2013).

I farmaci antiretrovirali sono suddivisi in sei classi ognuna delle quali è composta da farmaci che hanno come bersaglio una fase precisa del ciclo replicativo del virus. Il regime terapeutico che viene normalmente prescritto (ad eccezione di casi particolari) è composto da tre farmaci, due dei quali solitamente sono analoghi nucleotidici o nucleosidici (backbone) mentre il terzo è un farmaco appartenente ad un'altra classe. Gli studi START e Temprano hanno mostrato un chiaro beneficio clinico sulla progressione verso l'AIDS e sulla morte nei pazienti HIV positivi indipendentemente dalla conta delle cellule T CD4⁺, pertanto l'inizio dell'ART è consigliato a tutti i pazienti, sia nei soggetti in fase acuta che negli elite controllers (Linee Guida Italiane, 2017 INSIGHT START Study Group 2015; Temprano ANRS 12136 Study Group 2015).

Inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa (NRTIs). I farmaci che fanno parte di questa classe sono analoghi dei nucleotidi o nucleosidi che vengono incorporati nel filamento di DNA virale nascente bloccandone la sintesi e interferendo quindi con la retrotrascrizione. Tra i farmaci di questa classe, tenofovir disoproxil fumarato (TDF) è stato oggetto di particolari studi. TDF è tra le scelte consigliate in prima linea in caso di nuova diagnosi proprio per la

sua alta barriera genetica. È nota però la sua associazione con un severo declino delle funzioni renali con rischio di insorgenza di sindrome di Fanconi e con problemi al tessuto osseo (Bertoldi et al. 2017). Recentemente è stata approvata nella pratica clinica il tenofovir alafenamide (TAF), un profarmaco del tenofovir che, secondo i primi dati disponibili, mostra una tossicità nettamente inferiore sia a livello renale che osseo associata ad una maggiore penetrazione nei tessuti linfonodali conservando l'alta barriera genetica. Abacavir (ABC) invece ha la caratteristica peculiare di essere associato con una severa reazione allergica legata alla presenza dell'allele HLA-B*5701. Pertanto, pazienti a cui viene prescritto un regime che includa ABC devono essere preventivamente testati per la presenza di questo allele. Inoltre, sembra che l'assunzione di questo farmaco comporti un aumento del rischio cardiovascolare, soprattutto in pazienti con fattori di rischio multipli. La zidovudina (AZT) invece, è un analogo che è stato quasi del tutto dismesso nella pratica clinica comune (fatta eccezione per il suo utilizzo nei regimi di seconda linea nelle aree sub-Sahariane dell'Africa e poche altre regioni) a causa dei gravi effetti collaterali. Anche la stavudina, prima ampiamente utilizzata, attualmente viene prescritta raramente a causa della tossicità importante. Gli effetti tossici di questi due farmaci comprendono la steatosi epatica, l'acidosi lattica e lipoatrofia. Inoltre, l'AZT è associata ad anemia mentre la stavudina ad neuropatia (Deeks et al. 2015).

Inibitori della trascrittasi inversa non-nucleosidici (NNRTIs). L'azione di questi farmaci è data dal loro legame in una tasca dell'enzima RT causandone un cambio conformazionale che porta alla sua inibizione. In generale, si tratta di farmaci potenti e sicuri. Esistono però alcune eccezioni: efavirenz è noto per la sua tossicità nel sistema nervoso centrale ed è associato ad un aumento del rischio di depressione e suicidio. Nevirapina invece è associata con epatotossicità in pazienti con una conta delle cellule T CD4⁺ alta. Rilpivirina invece sembra essere uno dei farmaci più sicuri di questa classe anche se la sua potenza è minore rispetto agli altri pertanto la sua assunzione è consigliata in pazienti con una viremia < di 100,000 copie di RNA/ml e conta dei linfociti T CD4⁺ >200 cellule/μl (Linee Guida Italiane, 2017).

Inibitori della proteasi (PIs). I membri di questa classe vanno a bloccare i tagli proteolitici della proteasi virale che avvengono in seguito alla fuoriuscita del virione dalla cellula infetta e portano alla sua definitiva maturazione. Si tratta di farmaci molto efficaci, soprattutto se usati in combinazione con analoghi nucleosidici. Sono farmaci a metabolismo epatico e per

questo vengono solitamente somministrati in concomitanza con inibitori del metabolismo epatico per un'azione sinergica (ritonavir o cobicistat, definiti *booster*). Sono generalmente associati con lievi sintomi gastrointestinali e dislipidemia e, in alcuni casi, anche con disturbi cardiovascolari (fatta eccezione per darunavir e atazanavir). Studi recenti hanno mostrato una tendenza di atazanavir a causare iperbilirubinemia (Deeks et al. 2015).

Inibitori dell'integrasi (INSTIs). L'azione di questa classe è diretta verso la fase dell'integrazione del filamento di DNA all'interno del genoma della cellula ospite, bloccando e impedendo questo step. In generale, si tratta di una classe ad altissima barriera genetica molto ben tollerati e sicuri. Sia raltegravir (RTG) che dolutegravir (DTG) hanno mostrato non-inferiorità e in alcuni casi anche superiorità di azione rispetto ai regimi di prima linea. Elvitegravir, a causa del suo metabolismo epatico, necessita la presenza di un booster, il cobicistat (COBI), che ne impedisce la clearance epatica. È noto che questa combinazione di farmaci aumenta i livelli di creatinina sierica richiedendo un monitoraggio attento in pazienti con disfunzioni renali (German et al 2012).

Inibitori della fusione. I farmaci appartenenti a questa classe impediscono al virus di entrare nella cellula ospite. Il più noto è maraviroc che, legandosi al corecettore CCR5, impedisce al virus con tropismo R5 di entrare all'interno della cellula. Proprio per questa azione specifica, prima di essere prescritto al paziente, è essenziale che vengano eseguiti test che confermino l'assenza di virus a tropismo X4. Enfuvirtide invece lega direttamente HIV. Questo farmaco è raramente utilizzato in quanto deve essere assunto più volte al giorno e l'unica somministrazione disponibile al momento è per via parenterale (Deeks et al. 2015). Infine un ultimo farmaco non ancora in commercio ma che ha raggiunto la fase clinica sperimentale 3 è fostemsavir, un inibitore dell'entrata del virus che blocca i cambiamenti conformazionali di gp120. Gli ultimi dati disponibili a riguardo hanno mostrato in generale una buona tollerabilità e una buona efficacia indipendentemente dal tropismo virale in pazienti con ripetuti eventi di fallimento terapeutico e con limitate o nulle opzioni terapeutiche (Cahn et al, 2018). È stato però osservato che polimorfismi presenti su gp120 frequenti in virus appartenenti a gruppi non-M, possono causare resistenza al farmaco (Alessandri-Gradt et al. 2018).

1.4 LATENZA

Successivamente all'inizio di una terapia antiretrovirale efficace, la viremia plasmatica declina con un andamento che può essere suddiviso in quattro fasi: una prima fase in cui si assiste ad una perdita molto rapida del virus dovuta alla clearance delle cellule T CD4⁺ infette attivate. L'emivita di queste cellule infatti risulta essere molto breve (circa un giorno) a causa dell'effetto citopatico indotto dal virus o per meccanismi citolitici che vengono attivati dalla cellula stessa. Durante la seconda fase, la viremia cala più lentamente ma a ritmi comunque consistenti. Ciò è dovuto alla perdita di popolazioni cellulari la cui emivita è maggiore (da una a quattro settimane) quali i macrofagi, le cellule T CD4⁺ attivate parzialmente e le DCs. La terza fase invece copre un arco di tempo di diverse settimane e corrisponde alla clearance delle cellule di memoria. Questa fase è seguita da una quarta ed ultima fase la cui durata è stata proposta ricopra tutto l'arco di vita di un uomo (Finzi et al. 1999; Siliciano et al. 2003). In questa fase non si osserva un declino apprezzabile della viremia che, secondo alcuni studi si aggira attorno all'1-5 copie di RNA/ml (Abbas and Herbein 2012). Questo arco di tempo pressoché infinito è legato alla riattivazione (stocastica) delle *resting memory cells*, ovvero le cellule di memoria entrate in uno stato di quiescenza (Weinberger and Weinberger, 2013). Inoltre, l'interruzione dell'ART normalmente porta a un rapido innalzamento della viremia (*rebound*) ai livelli pre-ART dovuta alla produzione di virus da parte di quello che viene definito *reservoir* virale. Il reservoir è costituito da cellule infette che persistono all'interno dell'organismo per tutta la vita e che non riescono ad essere raggiunte dalla terapia (Siliciano et al. 2003).

È stato ampiamente documentato che il target di elezione di HIV è rappresentato da linfociti T CD4⁺ attivati (Ho et al. 1995; Wei et al. 1995) ma è interessante notare che HIV non è in grado di stabilire un'infezione efficace e produttiva nelle cellule T CD4⁺ quiescenti (Zhou et al. 2005). L'instaurarsi della latenza è legato al fatto che le cellule attive, come già accennato, muoiono in poco tempo ma alcune di queste reversiono in uno stato di quiescenza che ne prolunga enormemente l'emivita. Queste cellule di memoria quiescenti possono riattivarsi e portare alla produzione di virus infettante.

Il reservoir rappresenta perciò l'ostacolo maggiore per l'eradicazione di HIV ed è fonte di virus in caso di interruzione di terapia. La presenza di cellule di memoria infette e quiescenti rappresenta uno dei serbatoi maggiori di reservoir (Chomont et al. 2009).

Una cura per l'HIV, definita come controllo della replicazione virale in assenza di terapia, al momento non esiste ma diverse strategie sono state considerate.

La cura basata sull'eradicazione (*eradication cure*) del reservoir virale; è l'unica risultata efficace ma al momento non ripetibile. Si tratta di un trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche con un donatore di midollo omozigote per la delezione *CCR5Δ32*. L'unico successo è stato ottenuto nel paziente di Berlino affetto da leucemia mieloide acuta. Attualmente risulta essere aviremico pur in assenza di ART. Il trapianto è stato ripetuto anche in un altro paziente, detto paziente di Boston ma non si è riusciti ad ottenere lo stesso successo. Bisogna considerare che il paziente di Berlino ha subito anche severi rigetti graft vs host che potrebbero aver contribuito alla clearance delle cellule infette del sistema immunitario.

La cura funzionale (*functional cure*) tende al controllo della replicazione virale senza eliminazione del reservoir. Tra i vari approcci considerati troviamo: genome editing (per esempio la compromissione dell'integrità del provirus con CRISPR/Cas9), designer immune response (tra cui l'introduzione di chimeric antigen receptor, CAR, su linfociti T citotossici) o il controllo della replicazione virale come nel caso degli elite controller o dei PTCs.

Infine un approccio ibrido (*hybrid cure*) come il caso dell'approccio "shock and kill" dove il paziente assume assieme a LRAs (latency reversal agents) la normale ART. L'idea è di riattivare il provirus dalla latenza e immediatamente eliminarlo con la terapia antiretrovirale (Cillo and Mellors, 2016).

Al momento questi approcci risultano o estremamente rischiosi o inefficaci. È quindi importante analizzare i meccanismi che portano all'instaurarsi della latenza e i diversi tipi di reservoir che esistono.

Esistono di fatto due forme di latenza: latenza pre-integrazione e post-integrazione. La prima ha luogo in seguito a parziale o completo blocco del ciclo replicativo virale prima che l'integrazione sia avvenuta. Si ha così la formazione delle forme circolari che, nel caso si trovino bloccate nel citoplasma della cellula, sopravvivono per circa un giorno prima di essere eliminate; nel caso invece si localizzino nel nucleo riescono a rimanere stabili per almeno un mese in macrofagi attivi e non in replicazione. Queste forme sono comunque in grado di esprimere i geni virali e, nel caso si trovino all'interno del nucleo, potrebbero essere

soggette alla regolazione epigenetica della cromatina dell'ambiente circostante (Cara et al. 1996, Wu et al. 2001; Krishnan et al, 2006).

La latenza post-integrazione è quella più studiata e si ha quando il genoma virale completa con successo lo step di integrazione nel genoma cellulare. A questo punto la sua espressione è vincolata dall'emivita della cellula infettata e dalla sua progenie.

È dimostrato che tendenzialmente il sito di integrazione di HIV non è casuale: l'integrasi virale interagisce con il fattore cellulare LEDGF e con HRP-2 e questa interazione direziona il PIC preferenzialmente verso regioni introniche di geni trascrizionalmente attivi (Schroder et al. 2002; Han et al. 2004; Meehan et al. 2009). Questo dato è stato confermato anche da immagini al microscopio che mostrano la tendenza di HIV a integrarsi nelle regioni decondensate della cromatina presenti in prossimità della lamina nucleare e altamente trascritte (Dar et al. 2012). Tuttavia, non tutti gli eventi di integrazione sono guidati da questa interazione; se ciò non avviene, HIV si integra casualmente nel genoma dell'ospite e questo può avere diverse conseguenze. Se l'integrazione avviene in una regione di cromatina fortemente condensata, questo ambiente influenza il provirus e promuove l'instaurarsi della latenza. Inoltre, anche l'orientamento del provirus rispetto al gene in cui si integra è una fonte di variabilità nella trascrizione di HIV. È stato osservato che l'orientamento in parallelo con il gene cellulare interferisce con la trascrizione del provirus da parte dell'RNA polimerasi II (Lenasi et al. 2008) mentre se l'orientamento è antiparallelo le RNA polimerasi II possono collidere causando uno stop prematuro della trascrizione (Han et al. 2008). Nonostante ciò, l'attivazione della regione LTR di HIV grazie al legame di NF- κ B promuove fortemente la trascrizione superando le interferenze che la potrebbero bloccare (De Marco et al. 2008).

Nella latenza è importante considerare anche la struttura della cromatina, in particolare a livello del promotore di HIV. È nota la presenza costante di due nucleosomi, nuc-0 e nuc-1, al 5'LTR di HIV, anche quando l'integrazione avviene all'interno dell'eucromatina (Verdin et al. 1993). Questi nucleosomi regolano l'attività trascrizionale della regione 5'LTR. La riattivazione dalla latenza comporta il rimodellamento di nuc-1. Gli inibitori dell'istone deacetilasi promuovono la riattivazione dalla latenza e aumentano il reclutamento dell'RNA polimerasi II (Williams et al. 2006). La metilazione è un altro meccanismo attraverso cui può essere promossa la latenza. Il sito di inizio della trascrizione di HIV è affiancato da CpG islands che risultano metilate durante la latenza virale (Kauder et al. 2009).

Infine, l'interazione e la disponibilità di fattori di trascrizione cellulare è un elemento che va ad incidere sulla trascrizione dei geni virali. Per esempio è stato osservato che l'accessibilità della cromatina nei siti di integrazione del provirus è in grado di predire la soglia necessaria affinché NF-κB e RelA/p65 riescano ad attivare l'espressione genica virale (Dahabieh et al. 2015).

Concludendo, diversi fattori influenzano la latenza e la riattivazione del provirus integrato, dal sito di integrazione, all'orientamento del provirus, alla disponibilità di fattori di trascrizione cellulari fino ad arrivare all'ambiente cellulare stesso e allo stato e alla architettura della cromatina. Nonostante ciò, è idea condivisa che la riattivazione dalla latenza sia fondamentalmente un evento stocastico (Weinberger and Weinberger, 2013).

1.4.1 RESERVOIR ANATOMICI

Oltre al reservoir cellulare rappresentato principalmente dalle cellule T CD4⁺ quiescenti, esistono dei reservoir anatomici di HIV definiti santuari. Si tratta di compartimenti anatomici rappresentati da tessuti o organi che, è stato ipotizzato, siano meno accessibili alla terapia antiretrovirale. Probabilmente a livello di questi compartimenti le concentrazioni circolanti dei singoli farmaci che compongono la ART non sono sufficienti per bloccare la replicazione virale (Cory et al 2013). I santuari virologici più noti includono il GALT (gut-associated lymphoid tissues), i linfonodi, la milza, il tratto genitale, il sistema nervoso centrale (SNC), il fegato, i reni, i polmoni e il seno.

All'interno dei linfonodi, i linfociti T CD4⁺ infetti si trovano all'esterno dei centri germinali all'interno della paracorteccia ma, a causa delle cellule dendritiche follicolari in cui il virus rimane intrappolato, HIV di fatto è disseminato in tutto il linfonodo. Studi su modelli animali hanno mostrato, sia nei linfonodi che nella *milza*, la presenza di DNA ed RNA virale nonostante la viremia plasmatica non fosse rilevabile. Inoltre, è stato dimostrato che i farmaci antiretrovirali a livello di questi organi si trovavano a concentrazioni differenti rispetto a quelle plasmatiche avvalorando la teoria di una distribuzione anomala e non ottimale della terapia in questi compartimenti (Cory et al 2013).

La presenza di virus in attiva replicazione nel GALT in pazienti viremici è stata ampiamente documentata ed è idea condivisa che questo tessuto rappresenti un santuario anatomico di grande rilevanza nei pazienti HIV positivi. Chun e colleghi hanno ipotizzato che linfociti T

infetti latenti in questo compartimento costituiscano un importante reservoir. Sono state evidenziate forti analogie di sequenza tra il virus presente nel GALT e nei PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) del sangue periferico suggerendo che ci sia scambio attivo di virus tra sangue e GALT e che quindi questo tessuto possa rappresentare una fonte importante di virus circolante (Cory et al 2013).

L'invasione di HIV a livello del sistema nervoso centrale avviene già nelle prime fasi dell'infezione e sembra essere veicolata dai macrofagi. La presenza di una viremia rilevabile nel liquido cefalorachidiano è presente già dalla fase acuta dell'infezione, seppur con valori più bassi rispetto a quelli plasmatici. Che si tratti di virus in grado di muoversi nel liquido cefalorachidiano o di virus in attiva replicazione nel sistema nervoso centrale non è ancora stato chiarito. La presenza di virus replicante nel SNC è stata però verificata in autopsie da tessuti di pazienti con demenza associata a infezione da HIV (Swanstorm and Coffin, 2012).

La presenza di HIV nel tratto genitale è correlato con il rischio di trasmissione del virus per via sessuale. HIV è presente sia nel liquido seminale che nel muco del tratto genitale femminile. È stato osservato che il rischio di trasmissione di HIV correla sia con la viremia plasmatica che con la viremia nel liquido seminale pertanto la soppressione del virus al di sotto dei livelli di rilevabilità utilizzati in routine diagnostica mediante la ART riduce la probabilità di trasmissione, pur non annullandola completamente (Svicher et al. 2014).

Diversi studi hanno dimostrato la presenza di messaggeri virali a livello delle cellule renali (Bruggeman et al., 2000; Winston et al., 2001). Successivamente è stato osservato che, una volta integrato, il provirus è in grado di replicare e rilasciare virus in grado di infettare le cellule circostanti e i linfociti T CD4⁺ (Blasi et al., 2014). Il modello più accreditato, vede i linfociti T CD4⁺ infetti come la causa principale di trasmissione di infezione a livello renale (Chen et al., 2011). I dati raccolti fino ad ora suggeriscono quindi che il rene sia una fonte importante di reservoir virale in grado di produrre virus in grado di infettare e replicare in assenza di terapia (Bertoldi et al 2017).

Sia il fegato che i polmoni sono considerati reservoir anatomici di HIV. Per quanto riguarda il fegato è stata rilevata la presenza di diverse mutazioni che distingue le varianti virali presenti nel fegato con quelle circolanti avvalorando la tesi che vede il tessuto epatico come un reservoir anatomico per l'infezione da HIV (Blackard et al 2011). Inoltre, è stato riportato

che la presenza di HIV accelera la progressione verso la cirrosi in pazienti coinfecti HIV e HCV (Bruno et al. 2010; Macias et al. 2009).

A livello polmonare invece l'ipotesi è che i linfociti T CD4⁺ e i macrofagi alveolari siano target potenziali per l'infezione virale nei polmoni. L'importanza di questo reservoir anatomico correla con il rischio di locali infezioni opportunistiche in pazienti HIV positivi o polmoniti tubercolari. (Swanstorm and Coffin, 2012)

Infine il rischio di trasmissione di HIV attraverso l'allattamento al seno conferisce una grande importanza al seno come santuario anatomico di HIV. È possibile che macrofagi che esprimono DCSIGN giochino un ruolo di rilievo nella trasmissione di HIV attraverso il latte materno (Svicher et al. 2014).

1.4.2 PRINCIPALI METODICHE PER LA QUANTIFICAZIONE DEL RESERVOIR

La quantificazione del reservoir virale è uno degli obiettivi che ci si è posti nel campo della ricerca su HIV e rappresenta un argomento molto dibattuto e controverso. Si tratta di una sfida piuttosto impegnativa e al momento non esiste una metodica che riesca ad adempiere correttamente a questa necessità. Tutte le tecniche a disposizione al momento presentano i loro punti di forza e le loro debolezze. Questo problema riflette anche la diversità che esiste tra i vari reservoir anatomici e la capacità di questi metodi di analizzare questi reservoir oltre che la diversa sensibilità e specificità di ogni singolo saggio (fig 9). Di seguito verranno riportate le metodiche più importanti o comunemente utilizzate.

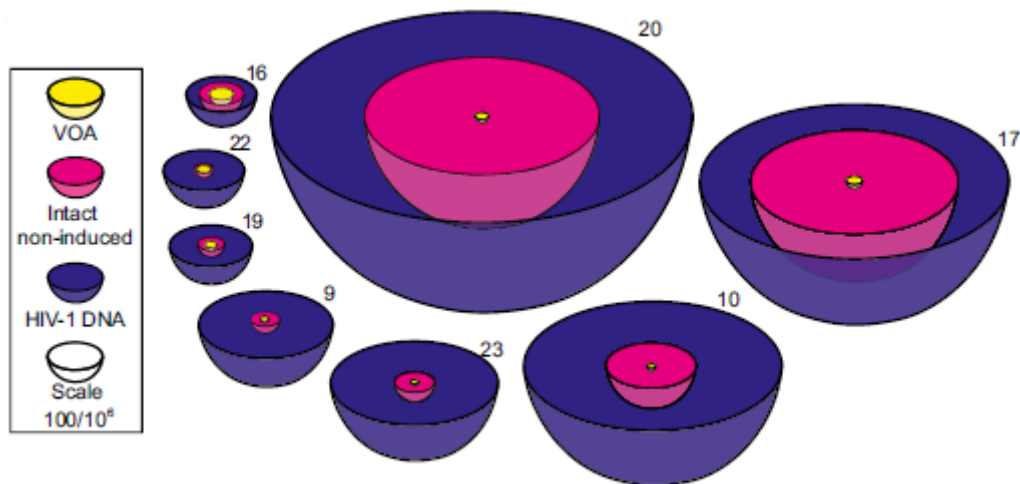


Figura 9. Rappresentazione in scala della frequenza delle cellule T CD4⁺ infette e la relativa capacità di quantificazione da parte alcune delle più note metodiche utilizzate (Ho et al. 2013).

1.4.2.1 HIV DNA

In generale, esistono diverse forme di HIV DNA, lineare non integrato, circolare non integrato e lineare integrato (fig. 6); ognuna di queste forme si può trovare in quantità variabili: normalmente la forma più abbondante è rappresentata dalla lineare non integrata, seguita dalla lineare integrata e per finire troviamo le forme circolari. Bisogna però considerare che l'abbondanza e la prevalenza di ognuna di queste forme varia a seconda dello stato di virosoppressione del paziente. Per esempio nei pazienti non virosoppressi le forme non integrate rappresentano la maggior parte dell'HIV DNA presente nel nucleo (circa 100 volte più frequente delle forme integrate) mentre in pazienti stabilmente virosoppressi la forma integrata costituisce la quasi totalità dell'HIV DNA.

La quantificazione dell'HIV DNA si può avvalere di due metodi: la real time PCR quantitativa (qPCR) o la droplet digital PCR (ddPCR). La prima, mediante l'utilizzo di una curva standard per l'interpolazione dei dati, va a monitorare l'aumento dell'amplificato nel tempo con l'utilizzo di una sonda a fluorescenza e misurando il segnale di fluorescenza alla fine di ogni ciclo di amplificazione. Questa metodica ha lo svantaggio di essere molto influenzabile da eventuali mismatch di primer e/o sonda e solitamente perde in accuratezza alle basse copie. La ddPCR invece utilizza una misurazione end-point della fluorescenza, ovvero solo alla fine di tutti i cicli di amplificazione. Si tratta di un sistema molto avanzato che permette di

eseguire contemporaneamente un numero molto alto di “micro-reazioni” (*droplets*, in quanto queste avvengono proprio all’interno di una goccia di olio termostabile). Ognuna di queste reazioni di PCR possono contenere una singola copia di bersaglio, più copie oppure nessuna. Una volta che la reazione è completata la fluorescenza di ognuna di queste reazioni microscopiche viene misurata. Il risultato è dato dal numero di droplets che sono risultate positivi al target e, basandosi sulla distribuzione di Poisson, è in grado di fornire il numero di copie presenti nel campione di partenza; il numero di replicati, ovvero di droplets, determinerà l’intervallo dinamico della reazione. Questa metodica risulta decisamente più robusta nei confronti delle variazioni della sequenza bersaglio rispetto alla qPCR e non necessita di una curva standard. È però una metodica più soggetta alla presenza di falsi positivi e ha un intervallo dinamico più limitato (Sharaf and Li, 2017).

1.4.2.1.1 HIV DNA TOTALE

La quantificazione del DNA totale è tra le metodiche più comunemente utilizzate sia per la semplicità di esecuzione che per il dato fornito. I target comunemente utilizzati sono i geni gag, pol o LTRs in quanto in queste regioni si possono trovare sequenze abbastanza conservate (questo è il caso soprattutto di pol e della regione LTR) e che riescono ad essere facilmente amplificate. In pazienti aviremici è stato osservato che la quantificazione dell’HIV DNA totale correla con le dimensioni del reservoir del DNA provirale ed è predittivo per un futuro fallimento terapeutico. Analizzando questo parametro però bisogna tenere presente che il valore fornito rappresenta una sovrastima del reservoir effettivo del paziente in quanto la maggior parte del genoma virale quantificato in realtà rappresenta virus difettivo non in grado di replicare. Inoltre bisogna considerare che l’HIV DNA non integrato ha un peso considerevole nella quantificazione del DNA totale ma contribuisce in modo marginale al reservoir virale per via del suo limitato (ma non nullo) potenziale trascrizionale. Come già accennato, questo parametro rimane comunque di grande importanza e tra i più comunemente analizzati (Avettand-Fenoel et al. 2016).

1.4.2.1.2 FORME CIRCOLARI

Le forme circolari si suddividono in 1-LTR e 2-LTR. In pazienti viremici le forme non integrate rappresentano la maggior parte del DNA totale di HIV ma, nel caso il paziente sia virosoppresso, le forme non integrate in generale e quelle circolari in particolare

costituiscono una popolazione minoritaria a causa della loro rapida clearance. Inoltre le forme circolari vengono ritrovate esclusivamente nel nucleo. La quantificazione di 1-LTR è poco affidabile e particolarmente impegnativa da ottenere per la mancanza di sequenze specifiche che possano fungere da bersaglio. La quantificazione di 2-LTR invece può essere ottenuta andando ad amplificare la regione a livello della giunzione tra le due sequenze LTRs (Sloan and Wainberg, 2011).

1.4.2.1.3 HIV DNA INTEGRATO

Per la quantificazione del DNA integrato si utilizza più frequentemente una nested-PCR Alu-gag. La scelta del primer per il DNA cellulare è ricaduta sulle sequenze Alu perché molto frequenti e sparse per tutto il genoma umano. Il secondo primer invece appaia sulla sequenza di HIV. Essendo l'integrazione di HIV casuale, il pre-amplificato sarà formato da una popolazione eterogenea di prodotti di lunghezza variabile. La successiva real time PCR fornirà una quantità di copie di provirus integrato. Bisogna però tenere presente che solo i provirus integrati nelle vicinanze delle sequenze Alu verranno amplificati e questo genera molta variabilità anche tra i replicati dello stesso campione.

Quando si considera la quantificazione del DNA integrato bisogna tenere presente che essa ha un significato interessante in caso di pazienti viremici, dove quindi le forme non integrate rappresentano la maggioranza. Nel caso di pazienti stabilmente virosoppressi si tende a far coincidere il DNA integrato con il DNA totale in quanto le forme non integrate rappresentano una percentuale bassissima (0,03-5%) del DNA totale. Per questo motivo, e per le difficoltà di esecuzione e quantificazione di questa forma di HIV DNA sopra riportate, in questi pazienti normalmente si considera solo la quantificazione del DNA totale (Pinzone and O'Doherty, 2018).

1.4.2.2 CELL-ASSOCIATED HIV RNA

Esistono diverse forme di RNA all'interno delle cellule infette: messaggeri completi (unspliced RNA, usRNA), messaggeri che hanno subito un singolo evento di slicing e messaggeri che hanno subito splicing completo (multiply spliced RNA, msRNA). Cell-associated RNA (CA-RNA) va ad analizzare la quantità di RNA presente all'interno della cellula infetta attraverso due metodiche, l'RT-qPCR e la ddPCR utilizzando primer e sonde specifici (Keselinova et al. 2014). Normalmente vengono utilizzati delle molecole LRAs per

stimolare le cellule e riattivare il virus dalla latenza. Solitamente per la quantificazione dell'RNA totale viene usata come target la sequenza LTR mentre per l'analisi dell'usRNA viene utilizzato gag come bersaglio. È noto in letteratura che i livelli di CA-RNA possono essere predittivi del rebound virale in seguito ad interruzione del regime terapeutico.

Le limitazioni di questa metodica rispecchiano quelle della quantificazione dell'HIV DNA in quanto la quantificazione ottenuta rappresenta una sovrastima del reservoir virale, seppur più contenuta rispetto al valore ottenuto con l'HIV DNA. La stima rappresenta un valore cumulativo e include anche forme difettive del virus e mutazioni read through.

1.4.2.3 TILDA

Il TILDA (Tat/Rev induced limiting dilution assay) è un saggio che misura la quantità di cellule presumibilmente in grado di produrre virus competente per la replicazione. Questo saggio quantifica l' mRNA di Tat/Rev e lo utilizza come marker surrogato della capacità delle cellule di produrre virus. La letteratura infatti riporta che frequentemente i provirus difettivi mancano del messaggero di Tat/Rev; partendo da questo presupposto, la presenza dell' mRNA di Tat/Rev riflette la capacità della cellula di produrre virus competente per la replicazione. Il TILDA si basa su diversi replicati di diluizioni seriali e note di cellule T CD4⁺ da paziente positivo. Parte di queste cellule vengono stimulate e, attraverso una nested PCR, si ottiene per ogni diluizione cellulare un numero di pozzetti positivi. Sottraendo dal numero dei pozzetti positivi contenenti cellule stimulate, il numero dei pozzetti positivi delle cellule non stimulate si ottengono dei valori che vengono poi analizzati statisticamente con il maximum likelihood method (fig. 14). Il risultato fornisce la frequenza delle cellule infette in grado di produrre virus competente per la replicazione. Seppure questo saggio abbia molti vantaggi e fornisca un dato ancora più accurato rispetto ai saggi precedentemente descritti, probabilmente il risultato che si ottiene rappresenta sempre una sovrastima del reservoir in quanto non tutte le cellule che rilasciano mRNA di Tat/Rev saranno effettivamente in grado di produrre virus infettante. Si tratta comunque di un buon compromesso tra le metodiche precedentemente descritte, in quanto nettamente più accurato, e il qVOA descritto nel prossimo paragrafo, sia per il quantitativo di sangue richiesto al paziente che per le tempistiche di allestimento del saggio. Infine è stato osservato che i risultati ottenuti con il TILDA correlano con i dati relativi al DNA integrato (Procopio et al. 2015; Sharaf and Li, 2017).

1.4.2.4 QUANTITATIVE VIRAL OUTGROWTH ASSAY

Il quantitative viral outgrowth assay (qVOA) è considerato il gold standard per la quantificazione del reservoir in quanto è l'unico saggio che in grado di rilevare effettivamente virus competente per la replicazione. L'allestimento di questo saggio prevede una serie di diluizioni seriali note di cellule T CD4⁺ di paziente HIV positivo. Dopo stimolazione viene misurata la quantità di p24 presente nei pozzetti stimolati ricavando il numero di cellule infette riattivate (Siliciano and Siliciano, 2005). Si tratta di un saggio molto robusto che è stato utilizzato per dimostrare la stabilità e il declino estremamente lento del reservoir nei pazienti virosoppressi. Nonostante i grandi vantaggi di questo saggio, il qVOA presenta degli svantaggi anche pratici altrettanto importanti che ne limitano fortemente l'utilizzo. Innanzitutto è un saggio molto elaborato e che richiede delle tempistiche molto lunghe, inoltre necessita di un volume di sangue da parte del paziente davvero consistente (Sharaf and Li, 2017). È stato dimostrato che questo saggio tenda a sottostimare la quantificazione del reservoir in quanto la stimolazione e la riattivazione delle cellule che ospitano provirus è efficace solo nell'1% dei casi in vitro (Ho et al, 2013). Ulteriori approfondimenti hanno stimato che il qVOA sottostima di circa 25 volte le reali dimensioni del reservoir. È interessante notare che i livelli di HIV DNA integrato sembrano correlare con la quantificazione ottenuta dall'allestimento di questo saggio (Ho et al, 2013; Bruner et al. 2016).

2. OBIETTIVO

Negli ultimi quindici anni la terapia antiretrovirale di combinazione a tre farmaci ha determinato una notevole riduzione della mortalità per infezione da HIV. In particolare, l'associazione di più classi farmacologiche, con target virali differenti, ha permesso a quasi il 90% dei pazienti attualmente in trattamento di avere un controllo stabile della replicazione virale (Raimondo et al. 2016). Tuttavia, è stato ampiamente dimostrato che la terapia antiretrovirale, seppur altamente efficace, non è in grado di eradicare l'infezione (Strain et al. 2003).

Nonostante i benefici indiscussi e l'estensione dell'aspettativa di vita dei pazienti infetti, sono sorte nuove complicazioni ed è venuta alla luce la necessità di far fronte a nuove esigenze. Sono noti e ampiamente documentati gli effetti tossici legati all'assunzione prolungata del regime terapeutico antiretrovirale, le cosiddette comorbidità, che possono colpire diversi apparati e tessuti tra cui il tessuto osseo, l'apparato cardiovascolare e il sistema nervoso centrale (Rodriguez-Penney et al. 2013). Inoltre, nonostante non sia un problema diretto nel campo della ricerca scientifica, i farmaci antiretrovirali sono farmaci piuttosto costosi che pesano sul Sistema Sanitario Nazionale: è stato osservato da diversi studi che, se il numero delle nuove infezioni diagnosticate ogni anno non cala, considerando i pazienti già infetti la cui aspettativa di vita nella maggior parte dei casi è praticamente pari a quella di un soggetto sano, tra alcuni anni il Sistema Sanitario non sarà più in grado di coprire la spesa necessaria per soddisfare la richiesta di farmaci antiretrovirali (Schackman et al. 2015; Treskova et al. 2016). Pertanto, la necessità di arrivare ad una cura nel minor tempo possibile è sempre più impellente.

Il reservoir virale rappresenta uno degli ostacoli maggiori, se non il maggiore, all'eradicazione del virus. Il reservoir è composto da una popolazione molto eterogenea sia di cellule che di organi e tessuti; i farmaci difficilmente raggiungono in questi distretti concentrazioni pienamente soppressive, e la produzione continua di virus, anche a basso numero di copie, favorisce il continuo riempimento dei serbatoi (Cory et al. 2013).

Una corretta misurazione del reservoir potrebbe fornire indicazioni importanti non solo in termini di una corretta valutazione del regime terapeutico ma anche di previsione e gestione di eventuali *escape* virali (Williams et al 2014).

E' noto come la quantità di HIV-DNA totale nel sangue periferico sia solo una misura approssimativa anche se ampiamente affidabile del reservoir virale complessivo presente nelle cellule infette dell'organismo. Pertanto, HIV-DNA è un marcatore prognostico predittivo di rischio di rebound virologico, che risulta indipendente da HIV-RNA. Esso rappresenta una delle misure più importanti per strategie future di eradicazione del virus (Avettand-Fenoel et al. 2016).

Oggi abbiamo a disposizione due saggi commerciali per la quantificazione del DNA totale; tuttavia mancano ulteriori metodiche in grado di misurare la latenza virale a 360 gradi, con un'analisi singola di tutte le forme di HIV-DNA che vengono a generarsi nel corso di un'infezione.

Inoltre, i metodi basati sulla PCR per la quantificazione di HIV-DNA totale sono stati spesso criticati per la loro incapacità di distinguere tra virus competenti da un punto di vista replicativo e virus difettivi; per questo motivo, la misura della frequenza delle cellule latentemente infettate nei pazienti HIV+ potrebbe fornire una stima più realistica delle dimensioni del reservoir (Avettand-Fenoel et al. 2016). Un saggio con tali caratteristiche è stato recentemente pubblicato da Procopio e colleghi (Procopio et al. 2015), anche se disegnato specificatamente per il sottotipo B, la cui diffusione è predominante soprattutto in Europa occidentale e in Nord America. Tuttavia, a livello mondiale, il sottotipo di HIV-1 maggiormente rappresentato è il C (UNAIDS 2018). Pertanto, accanto all'allestimento del TILDA così come descritto nel lavoro di Procopio, si rende necessario apportare alcune modifiche alla metodica, in modo tale da consentire una stima del reservoir anche su pazienti infetti con sottotipo C.

Questa tesi si prefigge la messa a punto e la validazione, accanto alle metodiche tradizionali di quantificazione di HIV-DNA totale, di saggi volti alla quantificazione non solo delle forme labili di HIV-DNA non integrate come 1-LTR e 2-LTR, ma anche di quella frazione di virus effettivamente *replication-competent*, sia nel sottotipo B che nel sottotipo C.

L'obbiettivo finale rimane quello di ottenere informazioni utili sulla carica totale e sull'infettività cellulare nei pazienti HIV infetti, al fine di individuare e validare un *cut-off* della carica virale, che possa guidare i clinici nelle eventuali scelte terapeutiche di semplificazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1 QUANTIFICAZIONE DELL'HIV DNA

Il DNA è stato estratto da pellet cellulare (5×10^6 cellule) con purificazione su colonnina (Quick-DNA Miniprep kit, Zymo Research) secondo le indicazioni fornite dalla ditta.

3.1.1 HIV-1 DNA TOTALE

Il DNA estratto è stato quantificato al Nanodrop (ThermoFisher Scientific) e un volume equivalente a 500 ng di DNA è stato testato in doppio per la presenza di HIV DNA totale (HIV-1 DNA qPCR kit, Diatheva) secondo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. La real time PCR è stata condotta su VERSANT kPCR Molecular System (Stratagene). La media dei risultati è stata espressa come copie di HIV-DNA/ 10^6 PBMCs.

3.1.2 QUANTIFICAZIONE DELLA FORMA CIRCOLARE 1-LTR

Per la costruzione della curva standard è stato utilizzato il plasmide pUC-1LTR (IDT), formato da un vettore di espressione al cui interno è stato inserito un frammento di 671bp con la sequenza dell'1-LTR. Il vettore contiene l'origine di replicazione pMB1 e la cassetta di resistenza all'ampicillina (fig. 10).

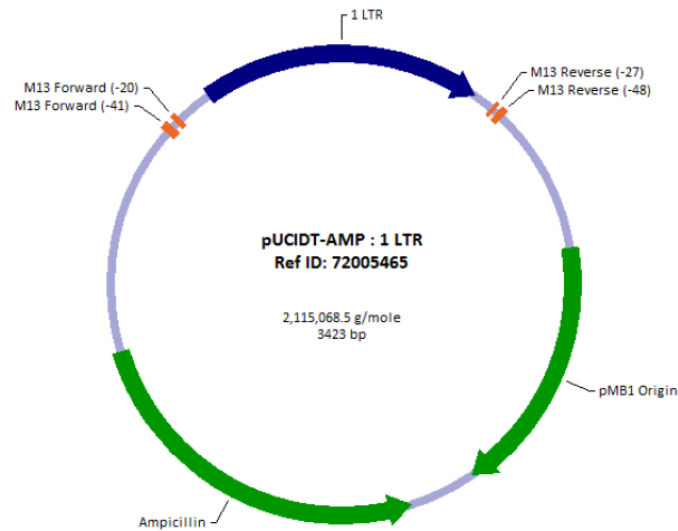


Figura 10. Mappa di pUC-1LTR.

Inoltre alle estremità dell'inserto sono stati inseriti alcuni siti di restrizione specifici (fig.11).

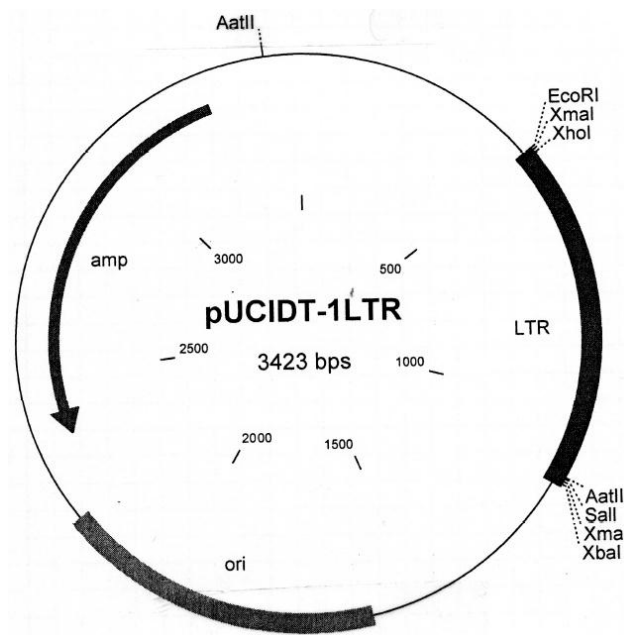


Figura 11. Principali siti di restrizione unici presenti sul plasmide pUC-1LTR utilizzati per il clonaggio.

I primers e la sonda testati sono riportati nella tabella 1 mentre la figura 12 mostra le regioni di appaiamento.

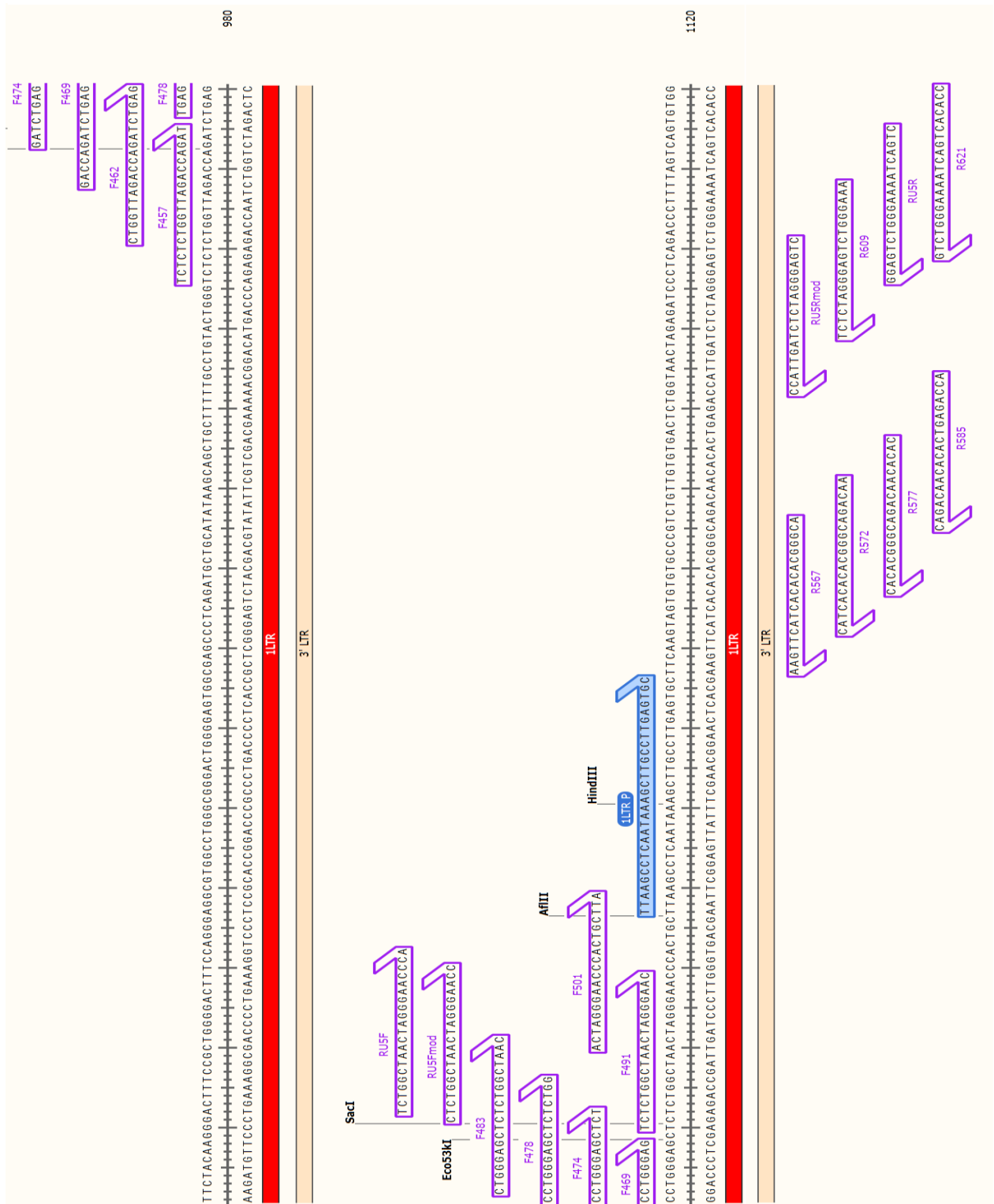


Figura 12. Siti di appaiamento dei primer testati sulla regione 1LTR.

La Real Time PCR è stata eseguita su Rotor-Gene Q (Qiagen). La mix di reazione contiene 10µl di 2X Buffer (QuantiFast SYBR Green PCR kit), primer forward (alla concentrazione finale di 1µM), primer reverse (alla concentrazione finale di 1µM), H₂O nucleasi-free, pUC-1LTR (a concentrazione nota). In alcuni esperimenti, alla master mix è stata aggiunta la sonda (a

concentrazione finale di 0,2 μ M) e DNA estratto da PBMCs di donatore sano (10³ PBMCs/reazione). Il profilo termico utilizzato è stato il seguente: 5 minuti a 95° C per l'attivazione iniziale, 40 cicli suddivisi in 10 secondi a 95° C, 30 secondi a 60° C con acquisizione del segnale SYBR Green (nel caso sia stata utilizzata la sonda, viene eseguita una seconda acquisizione nel canale del Cy3) e 30 secondi a 72° C con acquisizione nel verde (nel caso sia stata utilizzata la sonda, viene eseguita una seconda acquisizione del Cy3). Al termine dei cicli è stato inserito uno step per l'acquisizione della curva di melting.

Primer/ Sonda	Sequenza (5'-3')	Regione
RU5F	TCT GGC TAA CTA GGG AAC CCA	1LTR
RU5R	CTG ACT AAA AGG GTC TGA GG	1LTR
RU5Fmod	CTC TGG CTA ACT AGG GAA CC	1LTR
RU5Rmod	CTG AGG GAT CTC TAG TTA CC	1LTR
F457	TCT CTC TGG TTA GAC CAG AT	1LTR
F462	CTG GTT AGA CCA GAT CTG AG	1LTR
F469	GAC CAG ATC TGA GCC TGG GAG	1LTR
F474	GAT CTG AGC CTG GGA GCT CT	1LTR
F478	TGA GCC TGG GAG CTC TCT GG	1LTR
F483	CTG GGA GCT CTC TGG CTA AC	1LTR
F491	TCT CTG GCT AAC TAG GGA AC	1LTR
F501	ACT AGG GAA CCC ACT GCT TA	1LTR
R567	ACG GGC ACA CAC TAC TTG AA	1LTR
R572	AAC AGA CGG GCA CAC ACT AC	1LTR
R577	CAC ACA ACA GAC GGG CAC AC	1LTR
R585	ACC AGA GTC ACA CAA CAG AC	1LTR
R609	AAA GGG TCT GAG GGA TCT CT	1LTR
R621	CCA CAC TGA CTA AAA GGG TCT G	1LTR
1LTR P	[Cy3] TTA AGC CTC AAT AAA GCT TGC CTT GAG TGC [BHQ2]	1LTR

MH535	AAC TAG GGA ACC CAC TGC TTA AG	2LTR
MH536	CCA CAG ATC AAG GAT ATC TTG TC	2LTR
1LTRP	[Cy3] AAG TAG TGT GTG CCC GTC TGT TGT GTG ACT C [BHQ2]	2LTR
Act1	GAC AGG ATG CAG AAG GAG ATT ACT	Actina
Act2	TGA TCC ACA TCT GCT GGA AGG T	Actina
Tat1F C	GAA GAA GCG GAG ACA GCG A	mRNA Tat/Rev, clade C
Tat2F C	GCA GTG AGG ATC ATC AAA ATC CTA TAT CAA AGC A	mRNA Tat/Rev, clade C
Rev C	GGA TCT GTC TCT GTC TTG CTC TCC	mRNA Tat/Rev, clade C
Tilda C	[6FAM] CTT CTT CTT CGA TTC TTC CGA GCC TGT CGG GT [TAM]	mRNA Tat/Rev, clade C

Tabella 1. Sequenze dei primers e delle sonde utilizzati.

3.1.3 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE 2-LTR e QUANTIFICAZIONE DELLA FORMA CIRCOLARE 2-LTR

Un'aliquota di 1 µg di pUC-1LTR è stata digerita per 1h a 37° C con gli enzimi EcoRI e Sall (Roche) e, parallelamente, un'aliquota di 1 µg è stata digerita con gli enzimi EcoRI e XhoI (Roche) secondo le indicazioni fornite dalla ditta. Il prodotto della prima digestione è dato dal frammento 1-LTR, mentre la seconda ha comportato la linearizzazione del plasmide. Le due digestioni sono state fatte correre su un gel di agarosio 1% e le bande di interesse sono state estratte da gel (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen): la banda a 671 bp corrispondente all'inserto 1-LTR e la banda a 3412 bp corrispondente alla linearizzazione del plasmide, contenete ancora l'inserto.

In seguito a quantificazione al Nanodrop, la reazione di ligazione (T4 DNA Ligase, Promega), eseguita a temperatura ambiente per 1h, ha permesso la ligazione di 50 ng di pUC-1LTR linearizzato e 30 ng del frammento 1-LTR, ottenendo il nuovo plasmide pUC-2LTR contenente la giunzione 2LTR (fig. 13).

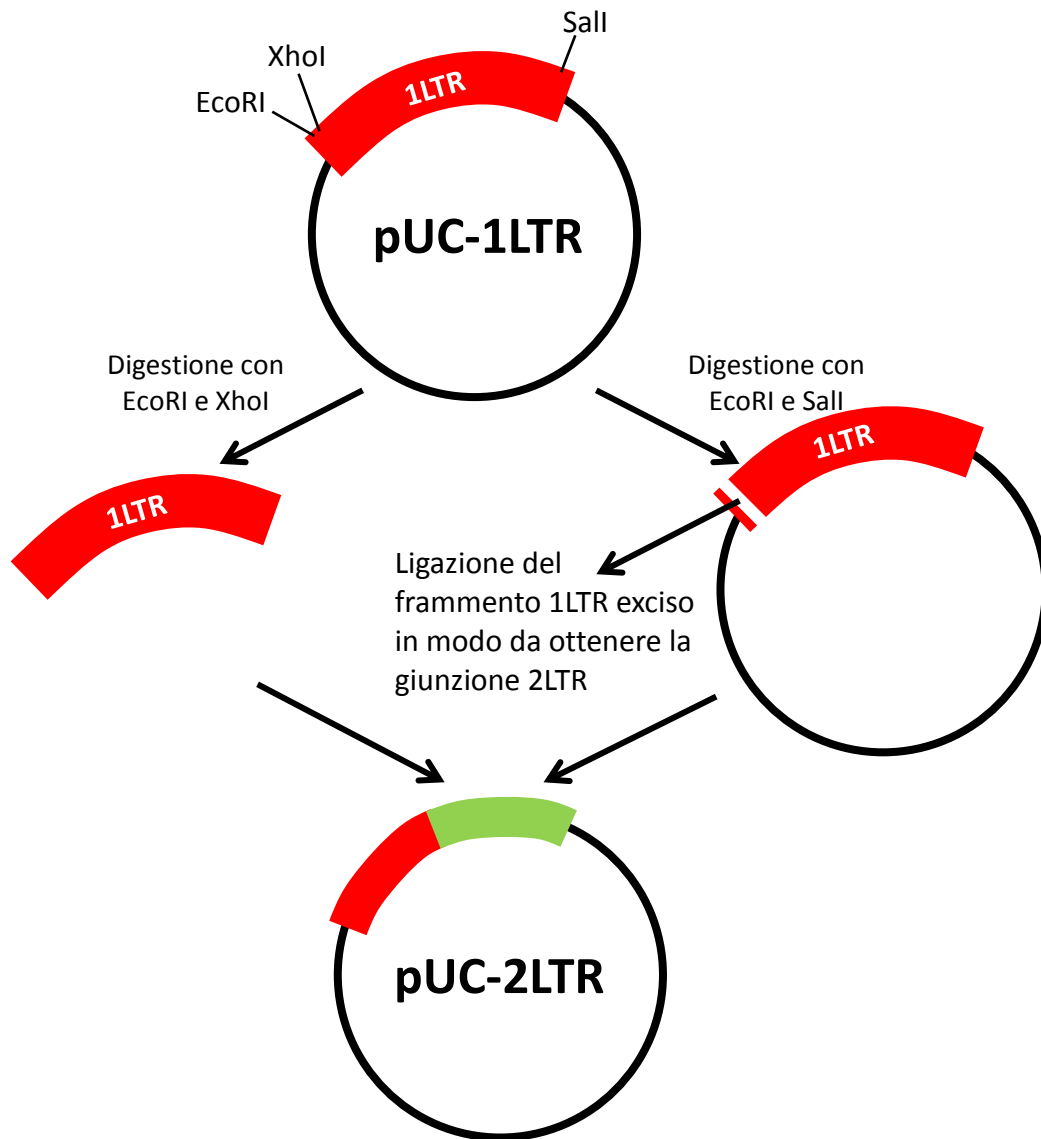


Figura 13. Rappresentazione schematica della costruzione del plasmide pUC-2LTR.

Batteri XL10-Gold (Stratagene) sono stati trasformati con metodo heat-shock secondo il protocollo fornito dalla ditta e lasciati crescere overnight a 37° C su piastre LB agar nobile addizionate con 100 µg/ml di ampicillina. Le colonie cresciute sono state seminate singolarmente in LB liquido addizionato con 100 µg/ml di ampicillina e lasciate in agitazione overnight a 37° C. Il plasmide è stato isolato con kit di estrazione (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche) e digerito 1h a 37° C con gli enzimi di restrizione Clal e SacI (Roche), secondo il protocollo fornito dalla ditta. I prodotti di digestione sono stati fatti correre su gel di agarosio 1% per verificare la presenza di tre bande: 562 bp, 819 bp e 2685 bp.

La curva standard è stata allestita come descritto nel paragrafo relativo alla quantificazione della forma 1LTR. Quando richiesto, è stato aggiunto un quantitativo di DNA da PBMCs di

donatore sano pari a 5×10^4 cellule/reazione. L'analisi su soggetti infetti ha previsto la quantificazione del DNA da paziente al Nanodrop e il caricamento di 500 ng di DNA/reazione.

3.2 TILDA

L'accuratezza del TILDA è stata saggiata su diluizioni scalari (da 10^6 copie/reazione a 10^0 copie/reazione) del plasmide pEV-731 contenente la sequenza dell'RNA messaggero di Tat/Rev (*Reference strain*, HIV-1 HXB2). La pre-amplificazione della curva standard è stata allestita secondo quanto descritto da Procopio e colleghi (Procopio et al. 2015). La successiva real time è stata eseguita utilizzando il kit PrecisionFAST qPCR Master Mix (PrimerDesign) seguendo il protocollo fornito.

L'allestimento del TILDA è stato eseguito secondo quanto riportato da Procopio e colleghi. Negli esperimenti condotti su pazienti sono state apportate modifiche alla concentrazione delle cellule saggiate (54×10^6 cellule/ml, 27×10^6 cellule/ml, 9×10^6 cellule/ml e 3×10^6 cellule/ml) e per la real time è stato utilizzato il kit PrecisionFAST qPCR Master Mix (PrimerDesign) (figura 14).

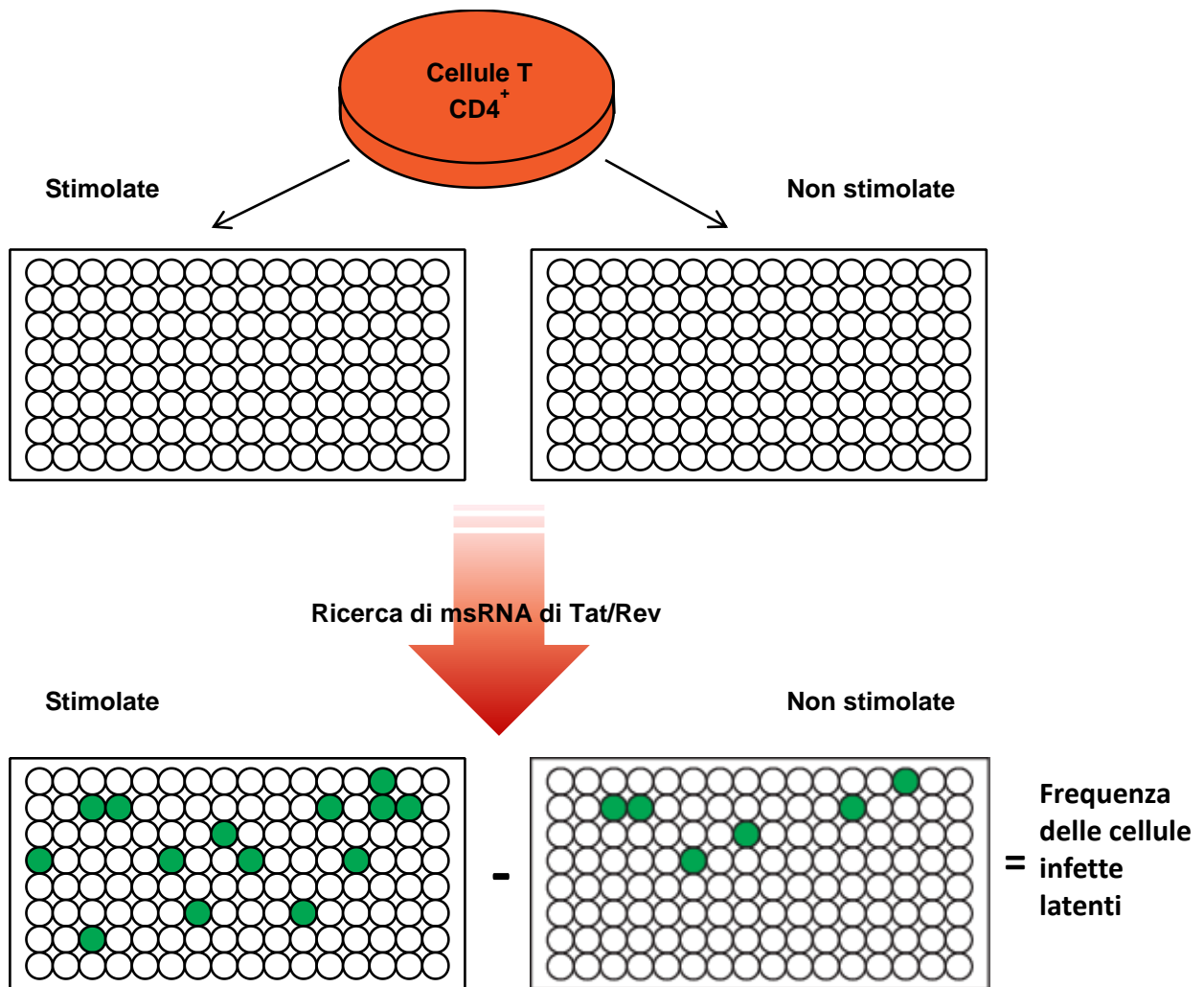


Figura 14. Rappresentazione schematica dell'allestimento del saggio TILDA.

Le sequenze di pazienti infetti con sottotipo C, depositate su HIV Sequence Database di Los Alamos, sono state analizzate con Mega Software e WebLogo e sulla base dei risultati sono scelte le regioni su cui disegnare i primers e la sonda per il sottotipo C (tabella 1).

Il frammento con la sequenza consenso del messaggero di Tat/Rev del sottotipo C (gBlocks Gene Fragment, IDT) è stato inserito all'interno del vettore pGEM-T Easy (Promega) con una reazione di ligazione (T4 DNA Ligase, Promega) e il plasmide ottenuto è stato amplificato all'interno dei batteri XL10-Gold (Stratagene) trasformati e seminati in piastre LB agar addizionate con 100 µg/ml di ampicillina. Le colonie cresciute sono state seminate singolarmente in LB liquido con 100 µg/ml di ampicillina. Il plasmide è stato isolato con kit di estrazione (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche) e digerito 1h a 37° C con gli enzimi di restrizione AatII e SacI (Roche). L'avvenuta inserzione del frammento è stata verificata con la corsa su gel di agarosio 1% (presenza di una banda a 250 bp e una a 2950 bp).

L'RNA da campione di paziente infetto con sottotipo C è stato estratto mediante purificazione su colonnina (RNeasy Mini Kit, Qiagen) e 500ng sono stati retrotrascritti e amplificati come descritto nel lavoro di Procopio e colleghi (Procopio et al. 2015); nella pre-amplificazione la coppia di primer Tat1F C-Rev C è stata utilizzata alla concentrazione finale di 0.25 μ M, mentre in nested è stata utilizzata la coppia di primer Tat2F C-Rev C (alla concentrazione finale di 0.25 μ M) con la sonda Tilda C (alla concentrazione finale di 0.1 μ M). Primer che amplificano il gene dell'actina sono stati utilizzati come housekeeping (vedi Tabella 1LTR). La real time è stata eseguita secondo le indicazioni fornite dal kit PrecisionFAST qPCR Master Mix (with SYBR GREEN, PrimerDesign) utilizzando entrambi i primer a una concentrazione finale di 0,3 μ M. La real time eseguita per la valutazione dell'actina prevede un'attivazione iniziale di 5 min a 95° C, 45 cicli di 10 sec a 95° C, 30 sec a 60° C e 30 sec a 72° C (acquisizione del SYBR Green alla fine di ogni ciclo). Al termine dei cicli è stato inserito uno step per l'acquisizione della curva di melting.

3.3 ARRUOLAMENTO DEI PAZIENTI E UTILIZZO DEI CAMPIONI

In seguito ad approvazione del Comitato Etico (progetto n. 245/2016/O/Oss), pazienti HIV-1 infetti sono stati arruolati previo consenso informato. I criteri di arruolamento includono un'età \geq 18 anni, assenza di coinfezioni con HBV e HCV, naïve alla terapia al momento dell'arruolamento. I prelievi (20 ml di sangue in EDTA) sono stati previsti a differenti *time point*: al basale, al momento della diagnosi e prima dell'inizio della terapia, a 6, 12, 18 mesi fino a 2 anni di follow-up.

Tutti i campioni sono stati resi anonimi e irrintracciabili.

La quantificazione della viremia plasmatica è stata eseguita mediante kit commerciale (COBAS® AMPLICOR, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA).

I donatori sani sono stati arruolati previo consenso informato e il campione è stato reso completamente anonimo.

3.4 ISOLAMENTO E COLTURA DEI PBMCs (SANI E DA PAZIENTE) E DELLE LINEE CELLULARI

I PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) sono stati isolati mediante gradiente di densità Ficoll (GE Healthcare) da sacche di donatori sani e da pazienti HIV-1 infetti. I PBMCs

sono stati in seguito coltivati in terreno RPMI 1640 (Euroclone), addizionato con 2mM di L-Glutammina (Euroclone), 10% di siero fetale bovino (FBS, Gibco, Life Technologies) e 1% di penicillina/streptomicina (Euroclone).

Dove richiesto, dai PBMCs sono stati isolati i linfociti T CD4⁺ mediante selezione negativa con magneti (EasySep™ Human CD4⁺ T Cell Isolation Kit, Stemcell Technologies). I linfociti T CD4⁺ sono stati coltivati in terreno RPMI 1640 con supplemento di 2mM L-Glutammina, 10% FBS e di 1% penicillina/streptomicina. Ove richiesta l'attivazione, il terreno di coltura è stato addizionato con 100ng/ml di forbolo miristato acetato (PMA, SigmaAldrich) e 1µg/ml di ionomicina (SigmaAldrich) per 12h.

Per gli esperimenti sono state utilizzate due linee cellulari: le Jurkat, linea cellulare immortalizzata non infetta di linfociti T provenienti da sangue periferico di un paziente con leucemia acuta linfoblastica a cellule T (NIBSC) e le J-Lat11.1 (NIH AIDS Reagent Program), linea cellulare latente derivata dalle Jurkat, contenenti l'intero genoma di HIV-1, con il gene Env non funzionale dovuto a una mutazione *frameshift* e il gene che codifica per la GFP al posto del gene Nef. Le linee cellulari sono state coltivate in terreno RPMI 1640 addizionato con 2mM di L-Glutammina, 10% FBS e 1% penicillina/streptomicina. Dove era richiesta l'attivazione, PMA e ionomicina sono state aggiunte al terreno di coltura, come precedentemente indicato. L'effettiva attivazione delle cellule è stata verificata in citofluorimetria (FACScalibur, Becton-Dickinson), utilizzando il software CellQuest (Becton-Dickinson).

Tutte le linee cellulari, sia immortalizzate che primarie, sono state mantenute in condizioni di sterilità a 37° C, con il 5% di CO₂.

3.5 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica ha previsto l'utilizzo del test T di Student e la deviazione standard per il calcolo della significatività dei dati di comparazione riguardanti l'HIV DNA.

L'analisi della frequenza delle cellule in cui era possibile indurre l'espressione dell'RNA messaggero di Tat/Rev è stata eseguita utilizzando il software disponibile online <http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda> per il calcolo del maximum likelihood method.

4. RISULTATI

4.1.1 HIV DNA 1-LTR E 2-LTR: ALLESTIMENTO DEI SAGGI DI QUANTIFICAZIONE

Attualmente in commercio sono disponibili solamente due kit commerciali per la quantificazione di HIV- DNA, non in grado di distinguere tra forme integrate (HIV-DNA provirale) e forme circolari non integrate (1-LTR e 2-LTR).

Per questo il nostro interesse si è focalizzato principalmente sulla quantificazione delle forme circolari non integrate e l'allestimento di una metodica che consentisse di quantificare separatamente sia le forme 2-LTR che 1-LTR per una miglior comprensione della patogenesi dell'infezione e del suo decorso clinico.

Per la quantificazione della forma circolare 1-LTR, abbiamo costruito una curva standard utilizzando diluizioni seriali (da 10^7 copie/reazione a 10^0 copie/reazione) del plasmide pUC-1LTR. La figura 10 illustra l'organizzazione del plasmide e in tabella 1 è riportata la sequenza nucleotidica di tutti i primer testati, disegnati in modo tale da coprire l'intera regione target (fig. 12). Inizialmente, l'analisi quantitativa, condotta mediante Real time PCR, è stata eseguita su diluizioni del plasmide in H₂O, senza l'utilizzo della sonda ma avvalendoci della chimica del SYBR Green; tale procedimento ha consentito di identificare le coppie di primer con miglior performance ovvero F457-R572, F483-RU5R, RU5F-RU5R, F501-RU5R, F501-R621. La figura 16 mostra un esempio dei risultati ottenuti in SYBR Green con queste coppie, in particolare viene mostrata la coppia F457-R572: la curva presenta un R² pari a 0.988 e una efficienza del 98.6%.

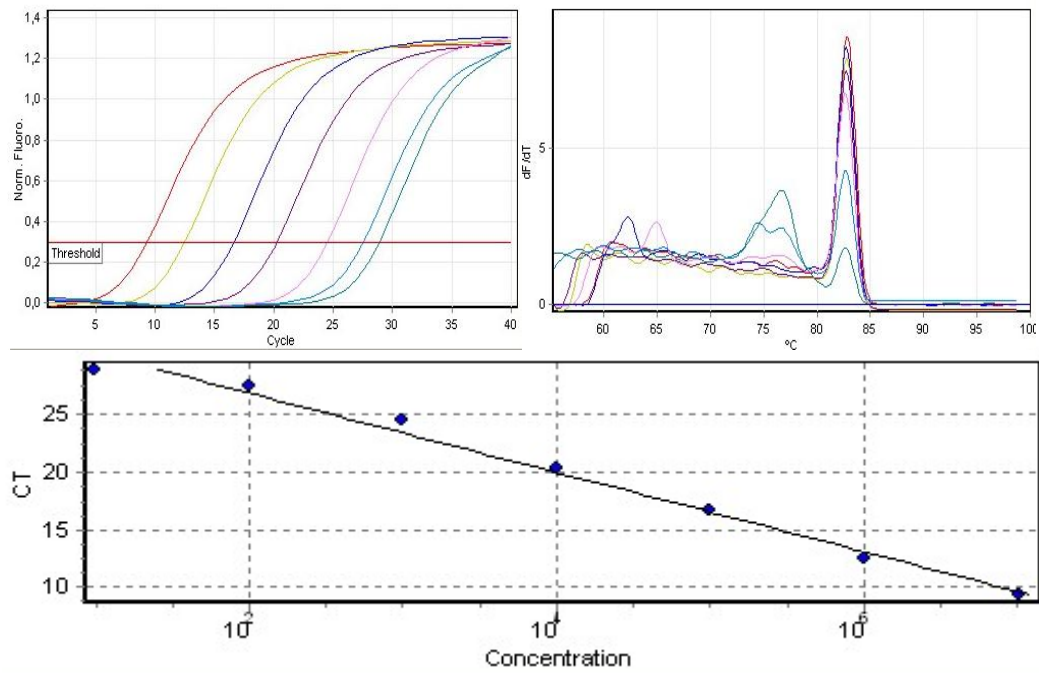


Figura 16. Esempio di curva standard ottenuta con la coppia di primer F457-R572 su diluizioni scalari di plasmide pUC-1LTR in Sybr Green.

Le coppie migliori sono state selezionate sulla base del picco di melting e della sensibilità mostrata durante la quantificazione. La curva standard è stata ripetuta in triplicato aggiungendo la sonda. Con l'aggiunta della sonda, è stato osservata perdita nella sensibilità di circa 3 cicli rispetto alla quantificazione in SYBR Green (fig. 17).

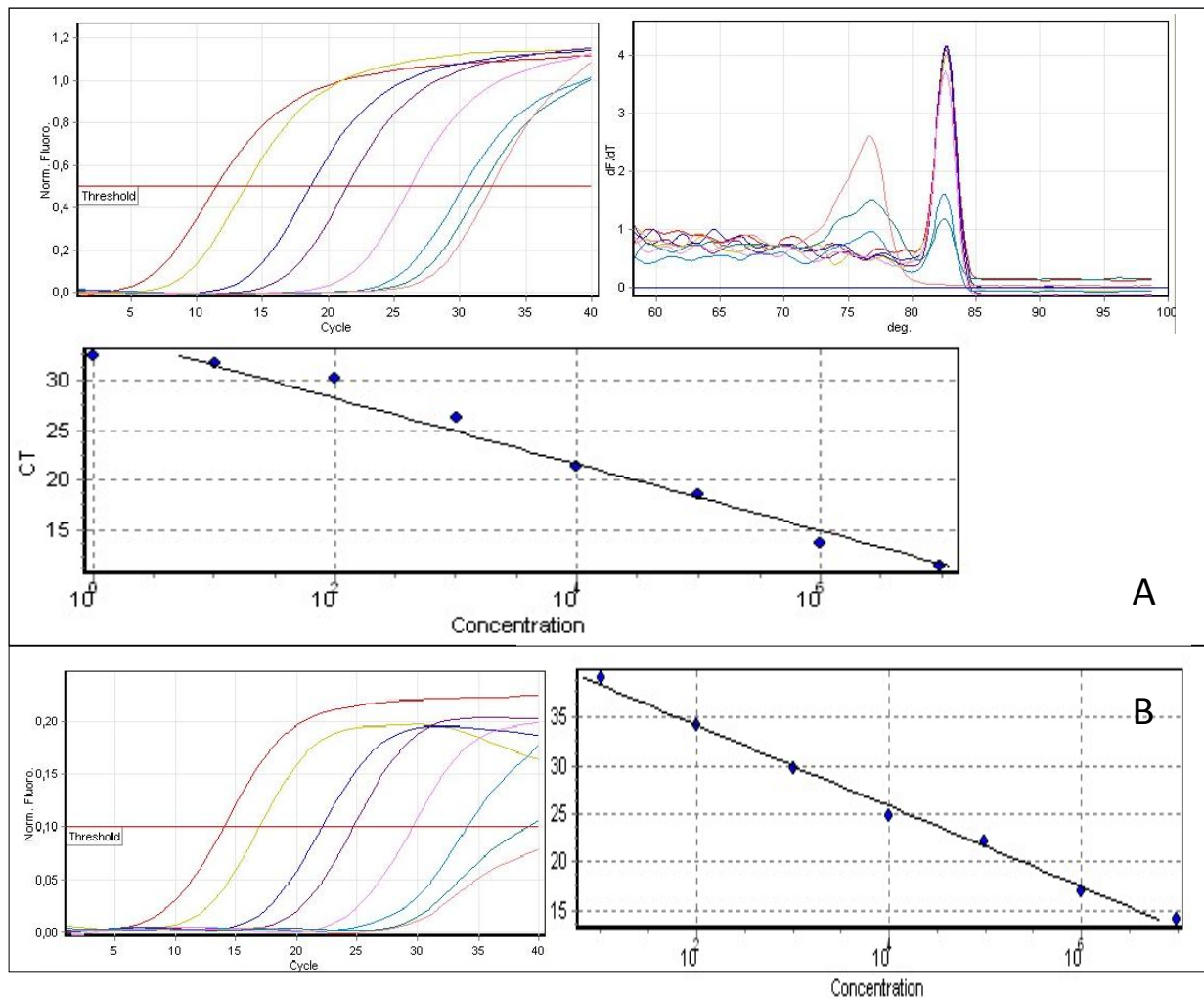


Figura 17. Esempio di curva standard con doppia acquisizione del segnale (SYBR Green e sonda oligonucleotidica).

Una volta stabilite le condizioni di PCR, la corsa è stata ripetuta aggiungendo, al posto di H₂O, una matrice di DNA ottenuta dai linfomonociti (PBMCs) di un donatore sano. Gran parte della sensibilità è stata persa sia con il SYBR Green che con la sonda in quanto la metodica non è in grado di quantificare al di sotto delle 10^2 copie/reazione. Il picco di melting ha confermato la presenza di target aspecifico, riconosciuto sia dai primer che dalla sonda; l'aspecificità del segnale si è ripresentata con tutte le coppie di primer selezionate. Ricerche più accurate hanno messo in luce una importante omologia di sequenza tra la regione 1-LTR di HIV e una sequenza presente sia sul cromosoma 2 che sul cromosoma 4 umano; questa scoperta ha escluso la messa a punto di una metodica per la quantificazione della regione 1-LTR di HIV. Né i primer pubblicati presenti in letteratura né le coppie disegnate dal nostro gruppo hanno permesso di aggirare questo ostacolo, pertanto

l'attenzione è stata focalizzata sulla messa a punto del saggio di quantificazione per la forma circolare 2-LTR.

4.1.2 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE pUC-2LTR

Il plasmide pUC-1LTR è stato digerito per ottenere la sequenza completa della forma 1-LTR e linearizzato in modo da creare delle estremità compatibili. In fig. 18A sono visibili le due bande del prodotto di digestione: una banda di 671bp corrispondente al frammento 1-LTR (A), una banda di 3412bp, corrispondente al plasmide linearizzato (B).

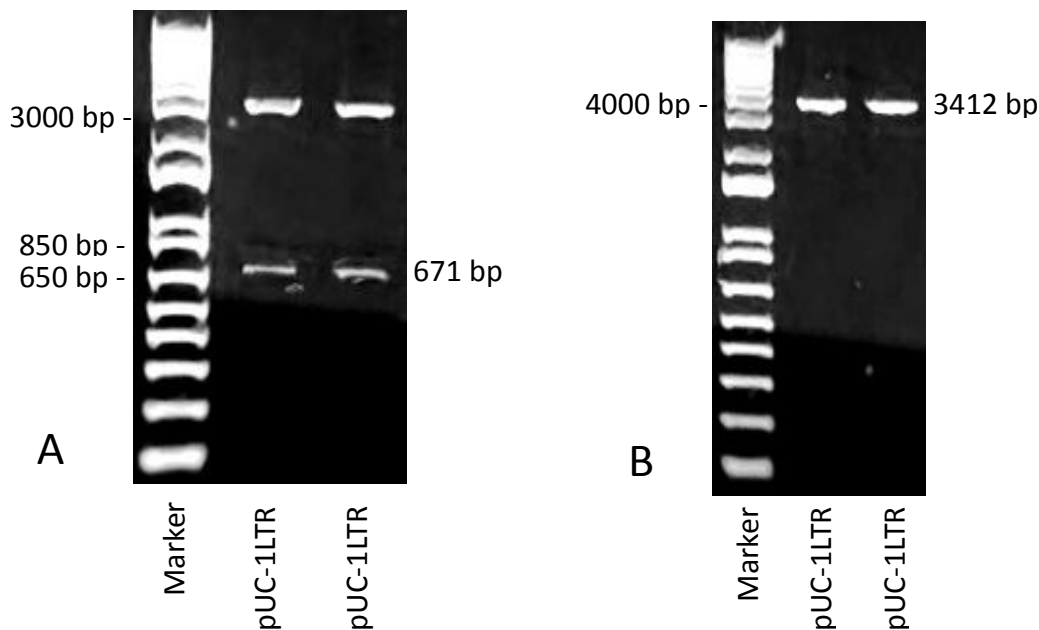


Figura 18. A) Isolamento del frammento 1LTR (671 bp). B) Linearizzazione del plasmide pUC-1LTR (3412 bp).

Mediante ligazione è stato ottenuto un nuovo plasmide pUC-2LTR contenete due sequenze 1-LTR ripetute in tandem (fig. 13). Per verificare il corretto orientamento dell'inserto, il plasmide è stato digerito con un enzima avente un sito unico di taglio all'interno della sequenza 1-LTR (tuttavia, essendo stata inserita una seconda sequenza LTR, si osserveranno due tagli) ed un altro enzima con un sito unico di taglio all'esterno della sequenza di interesse, sul vettore. La presenza di 3 differenti bande su gel di agarosio ha confermato la corretta inserzione del secondo frammento 1-LTR (fig. 19).

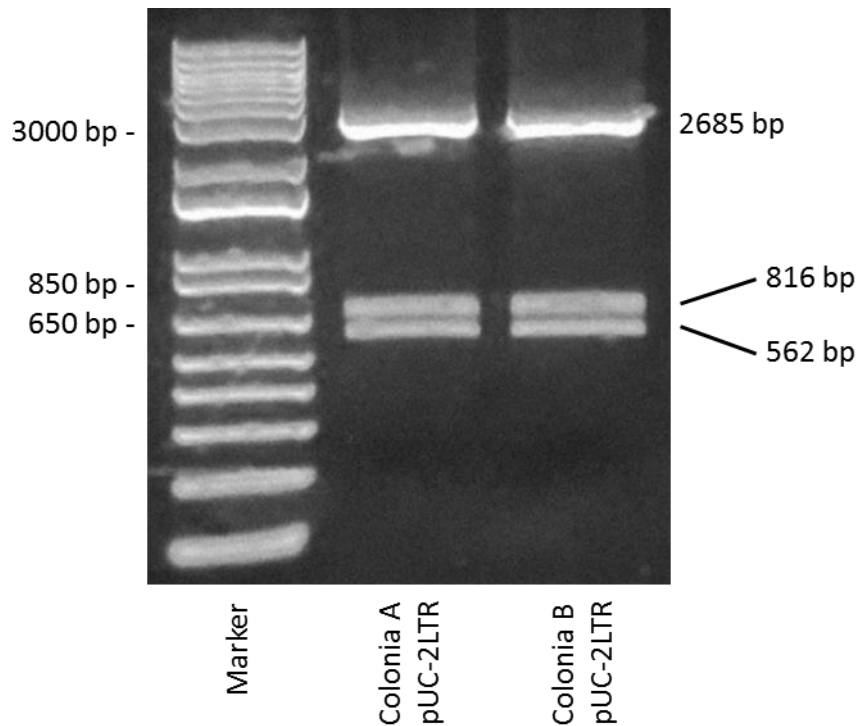


Figura 19. Conferma della corretta inserzione del frammento 1-LTR all'interno del plasmide linearizzato con tre differenti bande: una a 2685 bp, una a 816 bp e una a 562 bp.

4.1.3 COSTRUZIONE DELLA CURVA STANDARD DEL pUC-2LTR

Una volta accertata la corretta costruzione del plasmide di riferimento, si è proceduto alla messa a punto di una metodica quantitativa per 2-LTR secondo lo schema precedentemente utilizzato per la forma 1-LTR. Inizialmente è stata allestita la curva standard con diluizioni scalari in H₂O del plasmide da 10⁵ copie/reazione a 10⁰ copie/reazione; la coppia di primers MH535-MH536 (tabella 1) è stata testata inizialmente in SYBR Green (fig. 20A) e, in un secondo tempo, con l'aggiunta della sonda (fig. 20B). Il risultato in entrambi i casi è stato soddisfacente con un R² superiore a 0.98 ed un'efficienza compresa tra il 98% e il 104%.

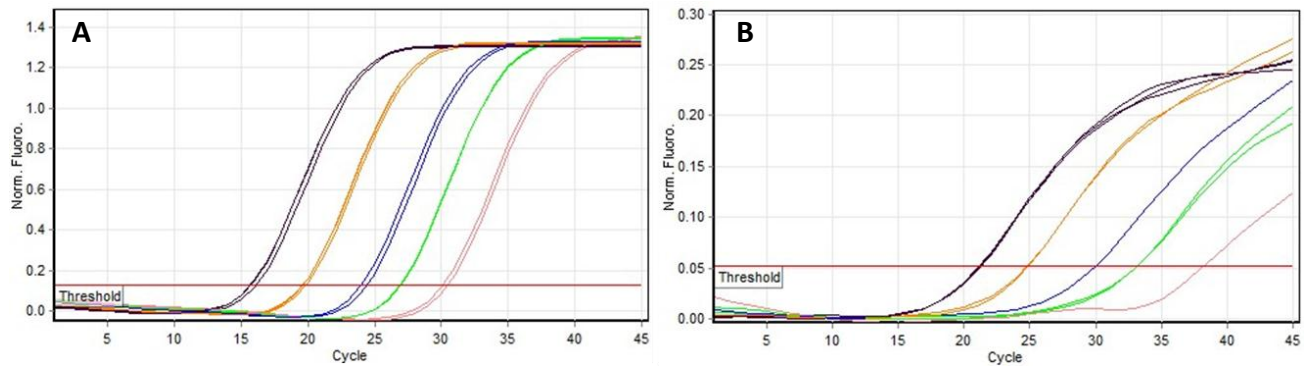


Figura 20. Diluizioni seriali del plasmide in H₂O. Inizialmente è stata testata la specificità dei primer (A) e in seguito la sonda (B).

Mantenendo invariate le condizioni utilizzate per la Real Time in cui è stata aggiunta la sonda, la curva standard è stata ripetuta in una matrice di 5×10^4 linfomonociti (PBMCs) da donatore sano (condizione che rispecchia maggiormente la situazione *in vivo*). La figura 21 mostra il risultato ottenuto con la sonda, con un R^2 pari a 0.99 e una efficienza pari a 112%. Durante l'analisi della curva di melting, l'assenza di picchi aspecifici ha confermato la specificità dei segnali ottenuti.

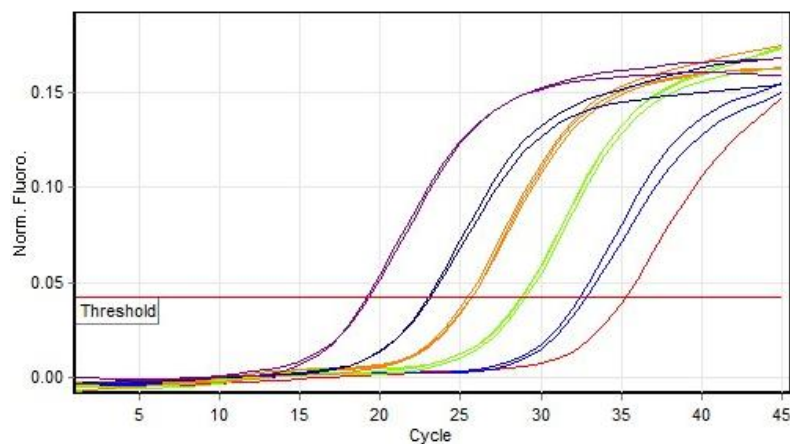


Figura 21. Curva standard ottenuta con diluizioni scalari di plasmide in una matrice di 5×10^4 PBMCs da donatore sano.

Avendo notato una perdita nelle performance della metodica *in house* in corrispondenza dei punti della curva a basso numero di copie, è stato deciso di allestire un'ulteriore curva standard aumentando i punti corrispondenti alla parte bassa e incrementando il numero dei loro replicati (fig. 22).

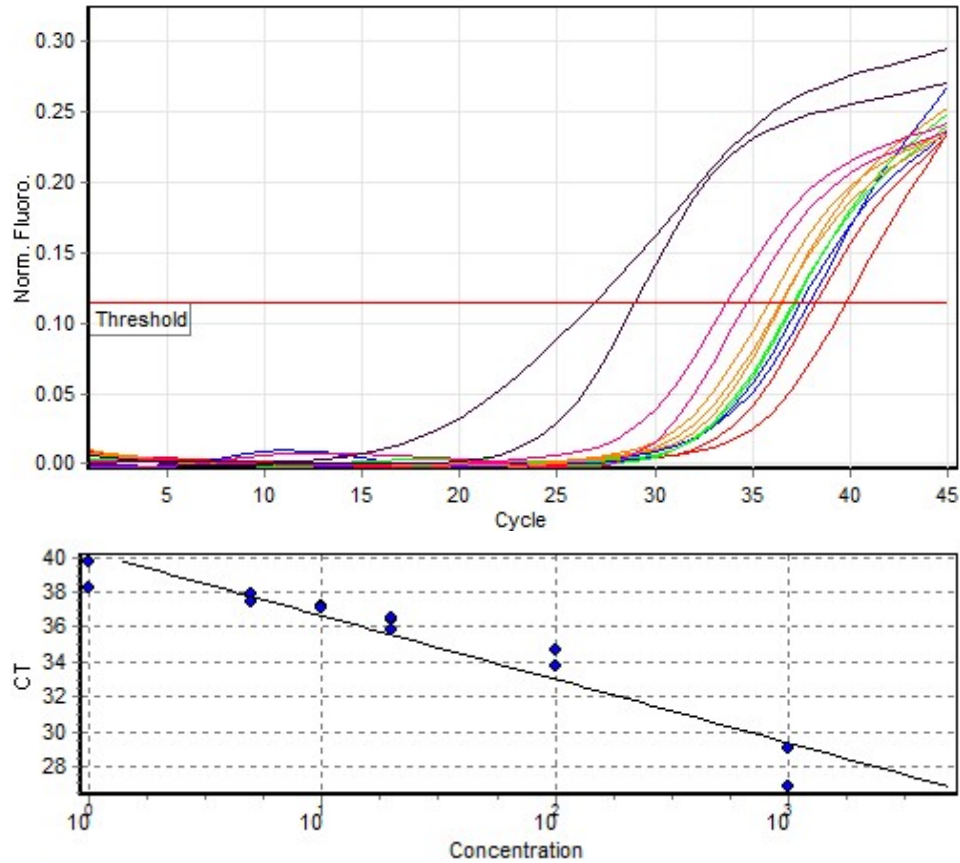


Figura 22. Allestimento di una curva standard con numeri bassi di copie/reazione (1000, 100, 20, 10, 5, 1 copie/reazione).

Parte dell'efficienza è stata persa (88%), tuttavia R^2 ottenuto è risultato pari a 0.9. L'acquisizione simultanea del SYBR green e della sonda ha consentito l'eliminazione dei valori derivanti dall'amplificazione di prodotti di PCR aspecifici.

4.2.1 ACCURATEZZA E PERFORMANCE DEL SAGGIO TILDA

Nonostante la quantificazione di HIV-DNA fornisca informazioni importanti relative il reservoir virale, questo dato rappresenta una sovrastima del reale serbatoio virale (Ho et al. 2013). Recentemente è stato pubblicato un nuovo saggio (TILDA, Tat-Rev Inducing Limiting Dilution Assay), volto alla quantificazione delle cellule latentemente infettate che ospitano virus competente da un punto di vista replicativo (Procopio et al, 2015). L'accuratezza della PCR è stata saggiata su uno standard rappresentato dal plasmide pEV-731. La retta di calibrazione della curva standard ha presentato un R^2 pari a 0,992 e un'efficienza pari al 114,1% (fig. 23).

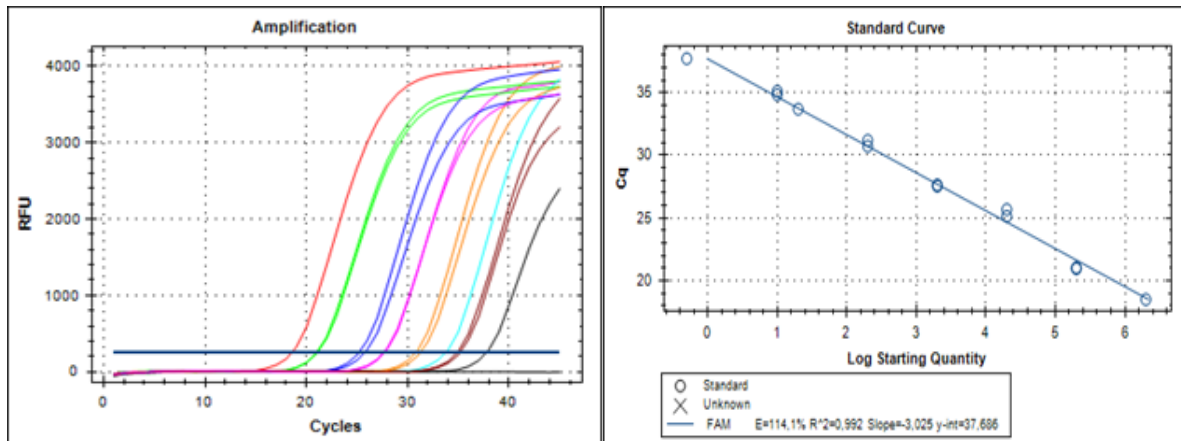


Figura 23. Retta di calibrazione su standard plasmidico, pEV731, per saggiare l'accuratezza della metodica di PCR.

Successivamente, è stato allestito un modello di latenza *in vitro* su cui eseguire il TILDA. La linea cellulare immortalizzata J-Lat 11.1 è stata utilizzata come modello cellulare latentemente infetto. Le cellule sono state stimulate 12h con PMA e ionomicina e sono state successivamente seminate a concentrazione nota con una linea cellulare non infetta (Jurkat). L'attivazione delle cellule J-Lat 11.1 è stata verificata in citofluorimetria in quanto l'attivazione di questa linea cellulare porta all'espressione della GFP. La figura 24 mostra che effettivamente il 95% delle cellule stimulate sono risultate attivate ed esprimono la GFP.

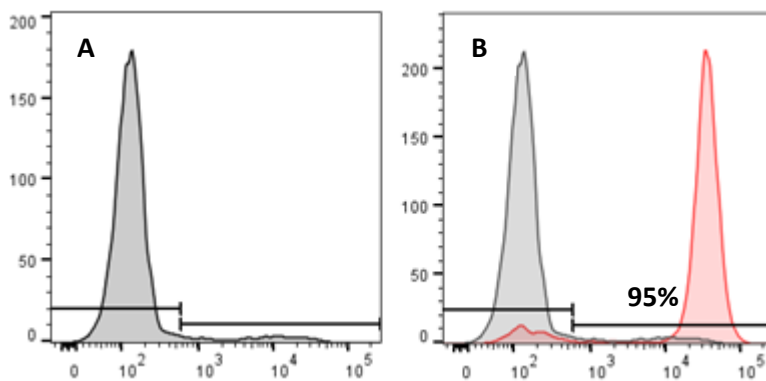


Figura 24. A) J-Lat 11.1 non stimulate; B) J-Lat 11.1 stimulate con una riattivazione pari al 95%.

Abbiamo quindi eseguito il TILDA come descritto da Procopio su tre diverse diluizioni seriali per testare le performance del saggio ed i risultati sono riportati in tabella 2.

Concentrazione JLat11.1/ 10 ⁶ Jurkat	Quantificazione con TILDA	Intervallo di confidenza (95%)
10	17	9-30
50	138	89-215
100	219	140-343

Tabella 2. Esecuzione del TILDA su un modello di latenza *in vitro* di J-Lat 11.1 e Jurkat a diverse concentrazioni. La frequenza delle cellule infette latenti per ogni diluizione presenta un intervallo di confidenza pari al 95%.

La conta cellulare è stata eseguita con camera di Burker e parte dell'errore nella stima delle cellule infette riattivate può essere riconducibile ad errori dell'operatore durante la conta, tenendo presente che si tratta di diluizioni con concentrazioni molto basse di cellule infette.

4.2.2 QUANTIFICAZIONE DEL RESERVOIR VIRALE MEDIANTE TILDA IN PAZIENTI VIROSOPPRESSI

Validata la metodica *in vitro*, il reservoir virale è stato quantificato mediante TILDA in alcuni pazienti HIV positivi in trattamento antivirale, aviremici da almeno 2 anni. La tabella 3 mostra le dimensioni del reservoir in 6 diversi pazienti; inizialmente la quantificazione è stata possibile solamente in tre campioni.

Paziente	Cellule infette latenti/10 ⁶ cellule T CD4 ⁺	Intervallo di confidenza (95%)
1	12	8-17
2	3	1-6
3	-	-
4	136	93-197
5	-	-
6	-	-

Tabella 3. Quantificazione del reservoir virale mediante saggio TILDA in pazienti virosoppressi.

Prima disponibilità del campione cellulare, il TILDA è stato ripetuto in doppio con una soddisfacente riproducibilità inter-assay.

4.2.3 ADATTAMENTO DEL SAGGIO TILDA AL SOTTOTIPO C DI HIV-1

Il saggio TILDA è stato messo a punto in particolare per il sottotipo B, come sottolineato da Procopio nel suo lavoro. Inizialmente, la quantificazione del reservoir virale nei pazienti 3, 5 e 6 è risultata fallimentare, nonostante il saggio sia stato condotto su oltre 4 milioni di linfociti T CD4⁺. In seguito ad un'analisi della sequenza, ottenuta dal sequenziamento della regione *pol*, questi pazienti sono risultati essere infetti con un sottotipo C di HIV-1. È stato ipotizzato che i primer e la sonda così come erano stati disegnati nel saggio originale, non fossero sufficientemente specifici per il sottotipo C. Sono stati quindi ridisegnati e la figura 25 mostra che riconoscono in modo specifico il sottotipo C.

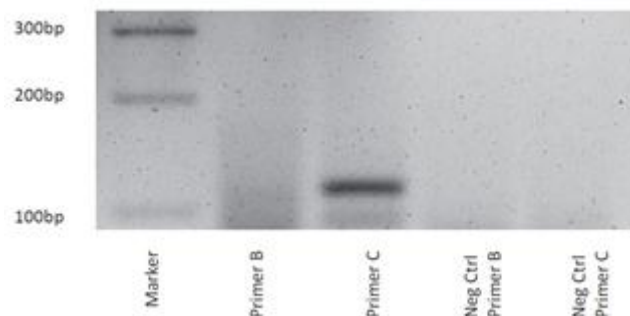


Figura 25. Specificità dei primer per il sottotipo C rispetto ai primer per il sottotipo B. I controlli negativi della retrotrascrizione mostrano che il campione non è contaminato.

Paziente	Cellule infette latenti/10 ⁶ cellule T CD4 ⁺	Intervallo di confidenza (95%)
1	12	8-17
2	3	1-6
3*	24	17-33
4	136	93-197
5*	7	4-12
6*	1	0-4

Tabella 4. Quantificazione del reservoir virale mediante saggio TILDA in pazienti virosoppressi. * Sottotipo C.

Una volta ottenuta la conferma della loro specificità, il TILDA è stato ripetuto con successo su tutti e tre i pazienti (tabella 4).

4.2.4 TILDA E REAL TIME PCR NEL SOTTOTIPO C DI HIV-1

4.2.4.1 COSTRUZIONE DEL PLASMIDE pTatRevC

È stato disegnato un frammento di DNA con la sequenza del messaggero di Tat/Rev sulla base delle sequenze di pazienti infetti con sottotipo C depositate sul database HIV Sequence di Los Alamos e la sequenza dei cloni molecolari a disposizione. Questo frammento è stato inserito all'interno del plasmide pGEM-T Easy (Promega) con una reazione di ligazione. Batteri XL10-gold sono stati trasformati con plasmide e le colonie sono state selezionate per la presenza dell'inserito orientato correttamente (figura 26).

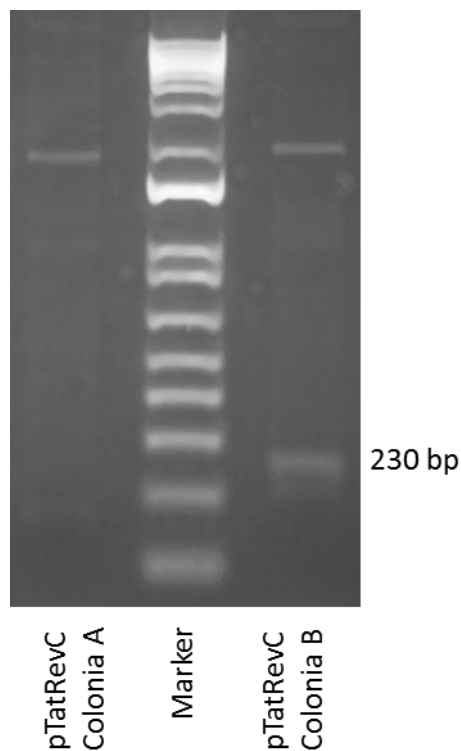


Figura 26. La colonia B presenta il frammento inserito con l'orientamento corretto.

Una volta ottenuto il plasmide, sono state eseguite delle diluizioni seriali ed è stata creata una curva standard (figura 27) che presenta un R^2 pari a 0.983 ed una efficienza del 130%.

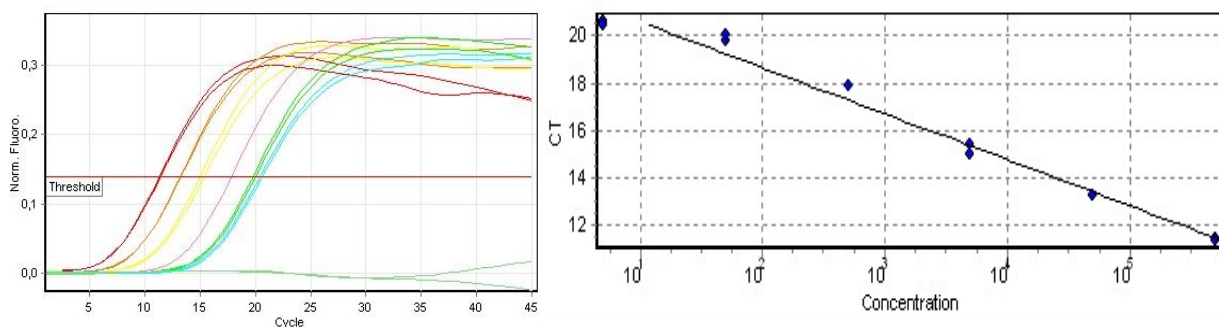


Figura 27. Curva standard di pTatRevC.

4.2.4.2 SENSIBILITÀ DEL SAGGIO TILDA E REAL TIME A CONFRONTO

Linfociti T CD4⁺ sono stati isolati da pazienti infetti con sottotipo C, stimolati 12h con PMA e ionomicina e raccolti. Dal pellet cellulare è stato estratto RNA virale e retrotrascritto. Il cDNA è stato pre-amplificato e successivamente quantificato in Real time.

Come mostra la tabella 5, in nessuno dei campioni si è riusciti a quantificare il messaggero di Tat/Rev, nonostante il paziente 7 presentasse una viremia plasmatica di oltre 500 copie/mL, indice di un'attiva replicazione virale.

Paziente	Viremia	Sottotipo	N°ciclo Actina	N°ciclo Tat/Rev
5	Non rilevata	C	13.1	No Ct
6	Non rilevata	C	13.01	No Ct
7	508 cp/ml	C	14.81	No Ct
8	Non rilevata	C	13.7	No Ct
9	Non rilevata	C	13.7	No Ct
10	< 20 cp/ml	C	13.9	No Ct
11	< 20 cp/ml	C	15.1	No Ct

Tabella 5. Real time per la ricerca del messaggero di Tat/Rev del C in pazienti con sottotipo C con quantificazione dell'housekeeping.

Inoltre, dal campione dei pazienti 5 e 6 è stato possibile isolare un numero adeguato di linfociti T CD4⁺ tale da consentire di eseguire il TILDA (tabella 4), quantificando rispettivamente un reservoir pari a 7 cellule infette latenti/10⁶ linfociti T CD4⁺ e 1 cellula infetta latente/10⁶ linfociti T CD4⁺.

4.3 QUANTIFICAZIONE DELL'HIV DNA TOTALE E DELLE 2-LTR IN PAZIENTI ARRUOLATI NELLO STUDIO CLINICO N. 245/2016/O/Oss

Una volta implementate nel laboratorio le metodiche sopra descritte, l'analisi del reservoir virale è stato condotto in alcuni pazienti arruolati nello studio clinico n. 245/2016/O/Oss approvato dal Comitato Etico. I linfomonociti (PBMCs) dei primi 7 pazienti arruolati sono stati isolati da sangue in toto mediante ficoll e successivamente, del pellet cellulare, è stato estratto il DNA. La quantificazione di HIV-DNA totale è stata ottenuta tramite saggio commerciale in Real Time PCR a tre diversi *time point*: T0, prima dell'inizio della terapia, T1, 6 mesi dopo l'inizio della terapia e T2, 12 mesi dall'inizio della terapia. La fig. 28 illustra l'andamento temporale di HIV DNA totale per ogni singolo paziente, mentre nella fig.29 viene mostrata la media di HIV-DNA (con deviazione standard, SD) ad ogni singolo *time point*.

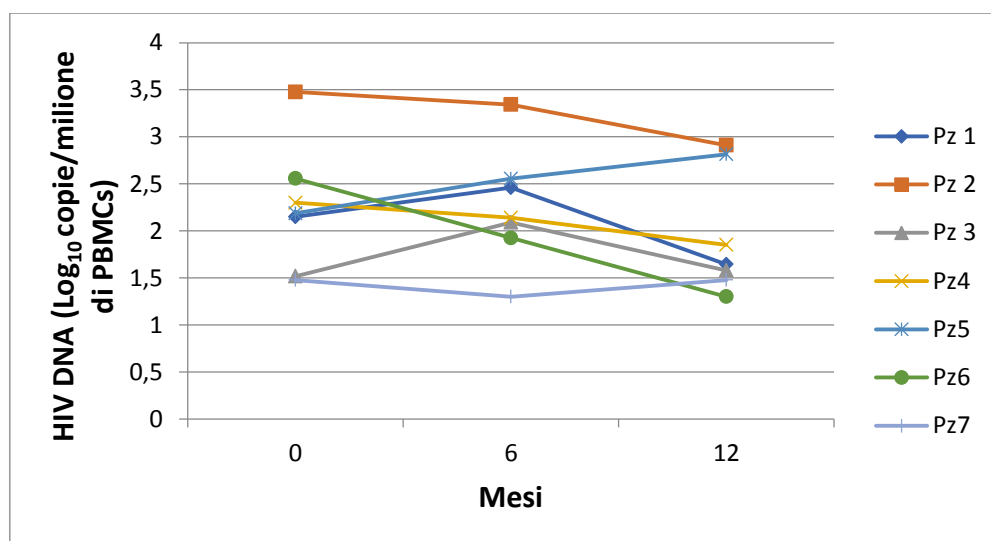


Figura 28. Andamento dell'HIV DNA totale a 0, 6 e 12 mesi dall'inizio della terapia in 7 pazienti.

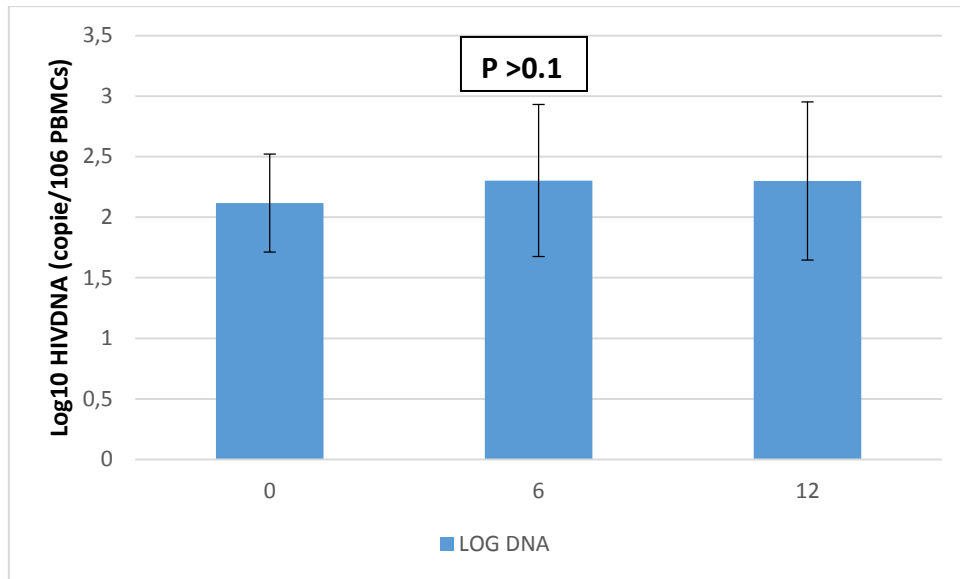


Figura 29. Media dell' HIV DNA totale a 0, 6 e 12 mesi dall'inizio della terapia.

Non è evidenziabile nessun calo significativo di HIV DNA totale in seguito all'inizio della terapia ($p > 0.1$).

Sugli stessi pazienti è stata eseguita la quantificazione della forma 2-LTR con la metodica sviluppata *in house*. I dati disponibili al momento riguardano i primi due time point (T0 e T1). La figura 30 mostra l'andamento del 2-LTR in parallelo con HIV DNA totale ai medesimi *time point*.

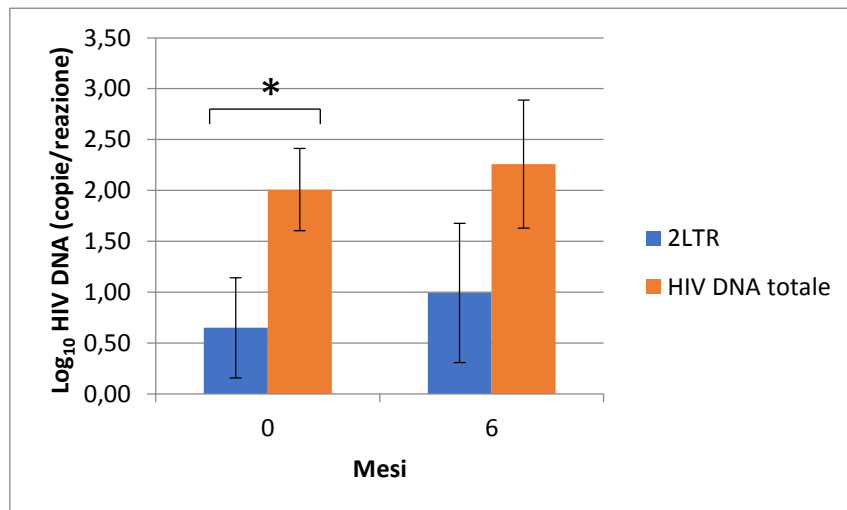


Figura 30. Media dell'HIV DNA totale e delle 2-LTR a 0 e 6 mesi dall'inizio della terapia.

* $P < 0.05$.

Al T0 si osserva una differenza statisticamente significativa tra HIV DNA totale e la forma 2-LTR ($P < 0.05$), significatività che si perde al *time point* successivo.

5. CONCLUSIONI

Al momento, l'eradicazione di HIV non è un obiettivo facilmente raggiungibile in quanto il virus è in grado di integrarsi nelle cellule target e, in alcuni casi, entrare in latenza. Queste cellule infette che non riescono ad essere debellate dalla terapia antiretrovirale costituiscono il reservoir virale e il maggiore ostacolo alla completa eliminazione del virus (Strain et al. 2003). Esistono diversi santuari anatomici in cui la presenza di HIV è stata dimostrata e all'interno dei quali la penetrazione dei farmaci antiretrovirali risulta avere concentrazione alterata rispetto a quella plasmatica, inficiando la loro azione (Cory et al. 2013). Inoltre, l'accesso a questi organi e tessuti, che potrebbe consentire una miglior comprensione della compartimentalizzazione del virus, spesso risulta piuttosto difficoltoso ed invasivo nei confronti del paziente. I linfociti T CD4⁺ infetti latenti rappresentano uno dei target di elezione di HIV e tra le maggiori fonti di reservoir virale; studi consolidati hanno stabilito che la maggior parte della viremia plasmatica è prodotta dalle cellule T CD4⁺ (Ho et al 1995; Perelson et al. 1997; Eisele and Siliciano, 2012). Queste cellule sono presenti nel sangue periferico e pertanto facilmente accessibili con un prelievo di sangue per eventuali indagini di approfondimento. Per questo motivo, durante lo svolgimento di questo progetto si è deciso di focalizzare le nostre analisi sui linfomonociti (PBMCs) in generale e sui linfociti T CD4⁺ in particolare.

È stato osservato che la misurazione del reservoir attraverso la quantificazione di HIV DNA rappresenta un marker surrogato fortemente correlato con il rebound virale e con la progressione della malattia (Williams et al 2014; Yerly et al. 2004).

Attualmente sono presenti in commercio solamente due kit standardizzati per la quantificazione di HIV DNA totale. Sono metodiche che hanno dimostrato una buona riproducibilità (Bon et al. 2017; Gantner et al. 2017) ed entrambe sono state utilizzate nel nostro laboratorio. Attualmente il kit per la quantificazione di HIV DNA totale in uso è quello della ditta Diatheva che si avvale della chimica SYBR Green. Avendo già a disposizione questo kit, il primo obiettivo dello studio è stata la messa a punto di una metodica che potesse darci delle informazioni più dettagliate riguardo le singole specie di HIV DNA, in particolare le forme circolari. Inizialmente ci siamo concentrati sulla quantificazione della forma 1-LTR con l'intento di focalizzarci, in un secondo tempo, su una tecnica che quantificasse anche la

forma 2-LTR. Dati preliminari hanno dimostrato però che la sequenza LTR della forma circolare 1-LTR presenta forti omologie con regioni cromosomiche umane presenti sui cromosomi 2 e 4 che incidono fortemente sulla sensibilità della metodica e sulla specificità dei dati ottenuti durante la quantificazione. Nonostante siano state testate diverse coppie di primer associate all'utilizzo di una sonda, i problemi nella quantificazione di questa forma di DNA circolare sono riportati anche in letteratura e al momento non esiste una metodica che sia in grado di provvedere alla sua quantificazione in maniera specifica (Yoder and Fisher, 2006; Mbisa et al. 2009). Pertanto, la nostra attenzione si è spostata sull'allestimento di un metodo per la quantificazione delle forme circolari 2-LTR. La coppia di primer selezionata è riportata in letteratura ed è stata utilizzata con successo in diversi articoli (Butler et al. 2001; Mandal and Prasad, 2009; Friedrich et al. 2010). La novità introdotta dal nostro gruppo risiede nell'uso della sonda: oltre ad aver modificato la regione di appaiamento, abbiamo utilizzato il Cy3, un fluoroforo che emette nello spettro del giallo. Questo ci ha consentito la simultanea acquisizione con il SYBR Green e l'esclusione di eventuali segnali aspecifici evidenziati con curva di melting; i risultati sono stati promettenti inducendoci ad utilizzare questa metodica su campioni di pazienti. In parallelo, gli stessi campioni sono stati quantificati con il kit commerciale per la quantificazione del DNA totale attualmente in uso. L'analisi di HIV DNA è stata eseguita su pazienti arruolati al momento della diagnosi e seguiti in follow up durante il primo anno di terapia per un progetto in corso che terminerà a due anni dall'arruolamento nello studio clinico. I dati preliminari riguardanti HIV DNA totale evidenziano la stabilità nel tempo di questo marcatore (fig. 29), dato confermato da diversi studi presenti in letteratura (Parisi et al. 2012; Williams et al. 2014; Bon et al. 2017).

Utilizzando la metodica *in house* allestita per la rilevazione della forma circolare 2-LTR, siamo andati a quantificare questa forma di HIV DNA negli stessi pazienti. I dati disponibili al momento riguardano il T0 e il T1. In generale non ci sono differenze significative tra i due *time point* anche se si osserva un lieve trend in aumento (fig. 30). È noto dalla letteratura che regimi a base di inibitori dell'integrasi (INSTI) causano un aumento transitorio nelle prime settimane delle forme circolari proprio perché vanno ad interferire con il processo di integrazione (Buzon et al. 2010; Nicastrì et al. 2011). Tuttavia, nonostante i pazienti in esame risultino effettivamente essere in terapia con Dolutegravir, un inibitore dell'integrasi di seconda generazione, è difficile ed azzardato trarre considerazione conclusive su un numero così esiguo di pazienti. Studi recenti condotti da Pace e colleghi, hanno mostrato che in

realtà la stabilità delle forme 2-LTR potrebbe essere maggiore di quella inizialmente ipotizzata e che la loro presenza potrebbe non essere associata alla presenza di virus in attiva replicazione (Pace et al. 2013).

Un lavoro recentemente pubblicato dal nostro gruppo di ricerca ha mostrato che regimi terapeutici duplici contenenti INSTI (quali Raltegravir) associati a inibitori della proteasi (PIs) presentano valori di HIV DNA totale significativamente più bassi rispetto a combinazioni di triplice in pazienti con una viremia plasmatica $<3 \log_{10}$ e una conta T CD4⁺ > 200 cellule/mm³ ad inizio terapia (Bon et al. 2017).

Gli INSTI, infatti, appartengono ad una classe di farmaci relativamente giovane che ha riscosso molto successo e interesse. Come già accennato, i farmaci di questa classe interferiscono con la fase di integrazione del virus nel genoma della cellula ospite; l'interesse nei loro confronti è dovuto principalmente alla loro potenza e al fatto che hanno mostrato di possedere un'alta barriera genetica (Elliot et al, 2017). Diversi studi hanno evidenziato che pazienti che assumono un regime terapeutico basato sugli inibitori dell'integrasi, nelle prime settimane dall'inizio della terapia mostrano un aumento della quantità di HIV DNA non integrato proprio come conseguenza del loro meccanismo di azione (Buzon et al. 2010; Nicastri et al. 2011).

Data l'impossibilità di andare a quantificare la forma 1-LTR sarebbe interessante, sulla base della terapia farmacologica assunta, andare a studiare anche l'andamento della forma 2-LTR nei 2 anni di follow up dei pazienti arruolati. Questo, assieme alla quantificazione di HIV DNA totale, ci consentirebbe di ottenere un quadro più dettagliato sullo stato e sulla composizione nel tempo del reservoir dei pazienti. Va specificato che al momento non sono state eseguiti studi di correlazione con i parametri viro-immunologici dei pazienti a causa del basso numero di soggetti arruolati ma, una volta raggiunta una casistica adeguata, questi aspetti verranno sicuramente approfonditi.

Come già discusso, la quantificazione di HIV DNA, nonostante sia una metodica abbastanza sensibile, di facile esecuzione e con un ampio range dinamico, ha il limite di essere poco specifica; il dato che si ottiene è un dato cumulativo che non distingue tra virus in grado di replicare e virus defettivo. D'altro canto il qVOA, da sempre considerato il gold standard, in grado di quantificare il virus infettante prodotto da cellule T CD4⁺ riattivate, è un saggio estremamente laborioso, che richiede un notevole volume di sangue per essere eseguito e fornisce un risultato in tempi lunghi (Siliciano and Siliciano, 2005). In aggiunta, è stato

dimostrato che il qVOA sottostima di circa 25 volte le reali dimensioni del reservoir (Ho et al 2013; Bruner et al 2016) in quanto si basa sull'utilizzo di LRAs (*latency reversal agents*) per la riattivazione del virus dalla latenza; diversi gruppi di ricerca hanno sottolineato come la riattivazione con queste molecole sia stocastica e legata ai livelli di Tat (Weinberger et al. 2005; Burnett et al 2009; Singh et al. 2010) e solamente l'1% delle cellule contenenti provirus rilasciano particelle virali in seguito a riattivazione *in vitro* (Ho et al 2013). La recente pubblicazione da parte di Procopio e colleghi del saggio TILDA per la quantificazione del messaggero di Tat/Rev ha costituito un compromesso tra la specificità del qVOA e la sensibilità di HIV DNA totale. Questo saggio utilizza diluizioni seriali di cellule T CD4⁺ riattivate di paziente HIV positivo e le analizza per la produzione del messaggero di Tat/Rev. Dati di letteratura riportano che la maggior parte dei provirus difettivi mancano del messaggero di Tat/Rev; pertanto, questo *multiple spliced* mRNA è utilizzato come marker surrogato della presenza di virus competente per la replicazione (Procopio et al. 2015).

Ulteriore obiettivo del progetto di ricerca è stato quello di implementare questo saggio nel nostro laboratorio per una applicazione diagnostica sui campioni clinici. Nella prima parte è stato utilizzato un modello di latenza per verificare l'effettiva accuratezza del metodo. Successivamente, abbiamo lavorato sui linfociti T CD4⁺ di pazienti infetti. Questo saggio si è dimostrato molto sensibile (tabella 3), in grado di quantificare reservoir estremamente contenuti da pazienti stabilmente virosoppressi; tale risultato non è stato invece ottenuto tramite la metodica di Real Time PCR classica (pazienti 5 e 6 nelle tabelle 4 e 5). Inoltre, è risultato piuttosto robusto e con una soddisfacente riproducibilità *inter-assay*: nei campioni in cui, grazie alla disponibilità cellulare è stato possibile ripetere il saggio in duplicato, il risultato ha confermato il dato precedentemente ottenuto.

Sono state apportate alcune modifiche rispetto al TILDA originale, aumentando il numero delle cellule saggiate nel caso di pazienti virosoppressi da più di 2 anni, in modo da riuscire a quantificare anche i reservoir più esigui. Questo aspetto è stato affrontato anche in un lavoro di recente pubblicazione (Chatel et al. 2018), in cui viene analizzato sia l'input delle cellule saggiate sia la quantità di pre-amplificato che viene utilizzato in nested PCR. In generale, quest'ultimo non incide particolarmente sul risultato se non in presenza di un basso numero di copie di messaggero. Nella loro analisi, Chatel et al. hanno consigliato di evitare il congelamento del pre-amplificato e di procedere subito con la nested PCR, in quanto il congelamento sembra incidere sulla qualità della quantificazione finale, seppure

non in maniera significativa. Durante i nostri esperimenti abbiamo sempre evitato il passaggio del pre-amplificato a -20°C proprio per eliminare ulteriori fattori di variabilità. Inoltre, il TILDA è stato eseguito anche su un paziente naïve alla terapia; tuttavia, il numero troppo elevato di cellule infette non ha reso possibile la quantificazione del reservoir e ne ha escluso l'utilizzo nelle fasi iniziali dell'iter diagnostico, prima dell'inizio della terapia (dati non mostrati).

L'ultima fase del progetto di ricerca ha visto un'ulteriore modifica del protocollo originale: la possibilità di quantificare il reservoir anche nei pazienti infetti con il sottotipo C. Il saggio così come è stato allestito nel lavoro di Procopio e colleghi non è in grado di misurare il reservoir in pazienti infetti con sottotipo diversi dal B. Nei tentativi iniziali di quantificare il reservoir del paziente 3, siamo arrivati a saggiare fino a 4 milioni di linfociti T CD4^+ senza riuscire a quantificare il messaggero di Tat/Rev. Nonostante sia noto che un paziente in regime antiretrovirale efficace, stabilmente virosoppresso da molti anni, presenta almeno 1 cellula infetta per milione di linfociti T CD4^+ (Josefsson et al. 2011), il mancato risultato di quantificazione del nostro paziente ha evidenziato una scarsa specificità dei primer e della sonda, che incide fortemente sul risultato finale del TILDA (fig.25). Nonostante il sottotipo più frequente in Europa Occidentale e in America del Nord sia il sottotipo B, a livello mondiale l'incidenza maggiore è data dal sottotipo C (UNAIDS 2018). In seguito agli importanti flussi migratori degli ultimi anni, il numero di pazienti infetti con sottotipo C afferenti al Centro di Malattie Infettive del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna è notevolmente aumentato mettendo in evidenza l'importanza di adattare le metodiche in uso alle nuove necessità. Le differenze tra diversi sottotipi di HIV-1 possono riguardare sia le sequenze del genoma che la risposta al trattamento. È stato osservato per esempio che il sottotipo C sembra essere associato ad un maggior rischio di fallimento terapeutico (Hagblom et al. 2016, Brenner et al. 2006).

Le modifiche apportate al TILDA hanno consentito la sua esecuzione anche in pazienti infetti con sottotipo C. Al momento la metodica è stata validata con successo su tre pazienti ma nel prossimo futuro si cercherà di ampliare la casistica includendo un numero maggiore di pazienti. Inoltre, tra gli obiettivi futuri, sarebbe interessante riuscire a correlare la quantità di mRNA di Tat/Rev espresso dalle cellule alla frequenza delle cellule infette latenti stesse.

Per concludere, il TILDA verrà sicuramente utilizzato per andare a studiare lo stato del reservoir al termine del follow up (ovvero a due anni) nei pazienti arruolati nello studio HIV

DNA. In questo modo, sarà possibile analizzare come correla la variazione di HIV DNA (sia totale che non integrato e, se possibile, anche la quota dell'integrato) nel tempo con la quantificazione finale del reservoir attraverso il TILDA.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbas W, Herbein G. Molecular Understanding of HIV-1 Latency. *Adv Virol*. 2012;2012:574967.

Alessandri-Gradt E, Charpentier C, Leoz M, Mourez T, Descamps D, Plantier JC. Impact of natural polymorphisms of HIV-1 non-group M on genotypic susceptibility to the attachment inhibitor fostemsavir. *J Antimicrob Chemother*. 2018 Oct 1;73(10):2716-2720.

Arnold E, Sarafianos SG. Molecular biology: an HIV secret uncovered. *Nature*. 2008 May 8;453(7192):169-70.

Arrildt KT, Joseph SB, Swanstrom R. The HIV-1 Env Protein: A Coat of Many Colors. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2012 March ; 9(1): 52–63.

Avettand-Fènoël V, Hocqueloux L, Cheret JGA, Frange P, Melard A, Viard JP, Rouzioux C. Total HIV-1 DNA, a Marker of Viral Reservoir Dynamics with Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Oct; 29(4): 859–880.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20;220(4599):868-71.

Batisse J, Guerrero S, Bernacchi S, Sleiman D, Gabus C, Darlix JL, Marquet R, Tisé C, Paillart JC. The role of Vif oligomerization and RNA chaperone activity in HIV-1 replication. *Virus Res*. 2012 Nov;169(2):361-76.

Bertoldi A, De Crignis E, Miserocchi A, Bon I, Musumeci G, Longo S, D'Urbano V, La Manna G, Calza L, Re MC. HIV and kidney: a dangerous liaison. *New Microbiol*. 2017 Jan;40(1):1-10.

Blackard JT, Ma G, Martin CM, Rouster SD, Shata MT, Sherman KE. HIV variability in the liver and evidence of possible compartmentalization. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Oct;27(10):1117-26.

Blasi M, Balakumaran B, Chen P, Negri DR, Cara A, Chen BK, Klotman ME. Renal epithelial cells produce and spread HIV-1 via T-cell contact. *AIDS*. 2014 Oct 23;28(16):2345-53.

Bon I, Musumeci G, Pavoni M, Miserocchi A, Lo Presti A, Morini S, Caio G, Della Vittoria A, Gibellini D, Re MC. Durable viral suppression in an HIV-infected patient in the absence of antiretroviral therapy. *New Microbiol.* 2015 Apr;38(2):289-92.

Bon I, Calza L, Musumeci G, Longo S, Bertoldi A, D'Urbano V, Gibellini D, Magistrelli E, Viale PL, Re MC. Impact of Different Antiretroviral Strategies on Total HIV-DNA Level in Virologically Suppressed HIV-1 Infected Patients. *Curr HIV Res.* 2017;15(6):448-455.

Bouwman RD, Palser A, Parry CM, Coulter E, Rasaiyaah J, Kellam P, Jenner RG. Human immunodeficiency virus Tat associates with a specific set of cellular RNAs. *Retrovirology* 2014;11:53.

Brenner BG, Oliveira M, Doualla-Bell F, Moisi DD, Ntemgwa M, Frankel F, Essex M, Wainberg MA. HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS.* 2006 Jun 12;20(9):F9-13.

Bruggeman LA, Ross MD, Tanji N, Cara A, Dikman S, Gordon RE, Burns GC, D'Agati VD, Winston JA, Klotman ME, Klotman PE. Renal epithelium is a previously unrecognized site of HIV-1 infection. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Nov;11(11):2079-87.

Bruner KM, Murray AJ, Pollack RA, Soliman MG, Laskey SB, Capoferri AA, Lai J, Strain MC, Lada SM, Hoh R, Ho YC, Richman DD, Deeks SG, Siliciano JD, Siliciano RF. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med.* 2016 Sep; 22(9):1043-9.

Bruno R, Galastri S, Sacchi P, Cima S, Caligiuri A, DeFranco R, Milani S, Gessani S, Fantuzzi L, Liotta F, Frosali F, Antonucci G, Pinzani M, Marra F. gp120 modulates the biology of human hepatic stellate cells: a link between HIV infection and liver fibrogenesis. *Gut.* 2010 Apr;59(4):513-20.

Burnett JC, Miller-Jensen K, Shah PS, Arkin AP, Schaffer DV. Control of stochastic gene expression by host factors at the HIV promoter. *PLoS Pathog.* 2009 Jan;5(1):e1000260.

Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science.* 1990 Sep 28;249(4976):1555-8.

Butler SL, Hansen MS, Bushman FD. A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat Med.* 2001 May;7(5):631-4.

Buzón MJ, Massanella M, Llibre JM, Esteve A, Dahl V, Puertas MC, Gatell JM, Domingo P, Paredes R, Sharkey M, Palmer S, Stevenson M, Clotet B, Blanco J, Martinez-Picado J. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med*. 2010 Apr;16(4):460-5.

Cahn P, Fink V, Patterson P. Fostemsavir: a new CD4 attachment inhibitor. *Curr Opin HIV AIDS*. 2018 Jul;13(4):341-345.

Calnan BJ, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD. Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev* 1991;5:201–210.

Cara A, Cereseto A, Lori F, Reitz MS: HIV-1 protein expression from synthetic circles of DNA mimicking the extrachromosomal forms of viral DNA. *J Biol Chem* 1996, 271:5393-5397.

Châtel L, Yang X, Cholette F, Soudeyns H, Sandstrom P, Lavigne C. Impact of pre-amplification conditions on sensitivity of the tat/rev induced limiting dilution assay. *Arch Virol*. 2018 Jun 7.

Chen P, Chen BK, Mosoian A, Hays T, Ross MJ, Klotman PE, Klotman ME. Virological synapses allow HIV-1 uptake and gene expression in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2011 Mar;22(3):496-507.

Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel MR, Ghattas G, Brechley JM, Schacker TW, Hill BJ, Douek DC, Routy JP, Haddad EK, Sékaly RP. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):893-900.

Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, Kottlilil S, Moir S, Mican JM, Mullins JI, Ward DJ, Kovacs JA, Mannon PJ, Fauci AS. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2008 Mar 1;197(5):714-20.

Cockerham LR, Hatano H, Deeks SG. Post-Treatment Controllers: Role in HIV "Cure" Research. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2016 Feb;13(1):1-9.

Coffin J, Swanstrom R. HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Jan; 3(1): a012526.

Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute-HIV-1 Infection: Basic, clinical and public health perspectives. *N Engl J Med* 2011;364: 1943–1954.

Coiras M, Camafeita E, Ureña T, López JA, Caballero F, Fernández B, López-Huertas MR, Pérez-Olmeda M, Alcamí J. . Modifications in the human T cell proteome induced by intracellular HIV-1 Tat protein expression. *Proteomics* 2006;6(Suppl 1):S63–S73.

Craigie R, Bushman FD. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Jul;2(7):a006890.

Cory TJ, Schacker TW, Stevenson M, Fletcher CV. Overcoming pharmacologic sanctuaries. *Curr Opin HIV AIDS*. 2013 May;8(3):190-5.

Dahabieh MS, Battivelli E, Verdin E. Understanding HIV latency: the road to an HIV cure. *Annu Rev Med*. 2015;66:407-21.

Dandekar DH, Ganesh KN, Mitra D. HIV-1 Tat directly binds to NF B enhancer sequence: role in viral and cellular gene expression. *Nucleic Acids Res* 2004;32:1270–1278.

Dar RD, Razooky BS, Singh A, Trimeloni TV, McCollum JM, Cox CD, Simpson ML, Weinberger LS. Transcriptional burst frequency and burst size are equally modulated across the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 23; 109(43):17454-9.

Davey RT Jr, Bhat N, Yoder C, Chun TW, Metcalf JA, Dewar R, Natarajan V, Lempicki RA, Adelsberger JW, Miller KD, Kovacs JA, Polis MA, Walker RE, Falloon J, Masur H, Gee D, Baseler M, Dimitrov DS, Fauci AS, Lane HC. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):15109-14.

Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Oct 1;1:15035.

De Guzman RN, Turner RB, Summers MF. Protein-RNA recognition. *Biopolymers*. 1998;48(2-3):181-95.

Delelis O, Carayon K, Saïb A, Deprez E, Mouscadet JF. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology*. 2008 Dec 17;5:114.

De Marco A, Biancotto C, Knezevich A, Maiuri P, Vardabasso C, Marcello A. Intragenic transcriptional cis-activation of the human immunodeficiency virus 1 does not result in allele-specific inhibition of the endogenous gene. *Retrovirology*. 2008 Nov 4;5:98.

Dhamija N, Choudhary D, Ladha JS, Pillai B, Mitra D. Tat predominantly associates with host promoter elements in HIV-1-infected T-cells-regulatory basis of transcriptional repression of c-Rel. *FEBS J* 2015;282:595–610.

Easley R, Carpio L, Dannenberg L, Choi S, Alani D, Van Duyne R, Guendel I, Klase Z, Agbottah E, KeHN-Hall K, Kashanchi F. Transcription through the HIV-1 nucleosomes: effects of the PBAF complex in Tat activated transcription. *Virology* 2010;405:322–333.

Edwards TE, Robinson BH, Sigurdsson ST. Identification of amino acids that promote specific and rigid TAR RNA-tat protein complex formation. *Chem Biol* 2005;12:329–337.

Egele C, Barbier P, Didier P, Piémont E, Allegro D, Chaloin O, Muller S, Peyrot V, Mély Y. Modulation of microtubule assembly by the HIV-1 Tat protein is strongly dependent on zinc binding to Tat. *Retrovirology* 2008;5:62.

Eisele E, Siliciano RF. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication. *Immunity*. 2012 Sep 21;37(3):377-88.

Elliot E, Chirwa M, Boffito M. How recent findings on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of integrase inhibitors can inform clinical use. *Curr Opin Infect Dis*. 2017 Feb;30(1):58-73.

Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, Lysenko ES, Bosch RJ, Lai J, Chioma S, Emad F, Abdel-Mohsen M, Hoh R, Hecht F, Hunt P, Somsouk M, Wong J, Johnston R, Siliciano RF, Richman DD, O'Doherty U, Palmer S, Deeks SG, Siliciano JD. Comparative analysis of measures of viral reservoirs in HIV-1 eradication studies. *PLoS Pathog*. 2013 Feb;9(2):e1003174.

Exline CM, Feng Z, Stoltzfus CM. Negative and positive mRNA splicing elements act competitively to regulate human immunodeficiency virus type 1 vif gene expression. *J Virol*. 2008 Apr;82(8):3921-31.

Fauci AS, Desrosiers RC 1997. Pathogenesis of HIV and SIV. In *Retroviruses*(ed. Coffin JM, et al.), pp. 587–635 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Felli C, Vincentini O, Silano M, Masotti A. HIV-1 Nef Signaling in Intestinal Mucosa Epithelium Suggests the Existence of an Active Inter-kingdom Crosstalk Mediated by Exosomes. *Front Microbiol.* 2017 Jun 8;8:1022.

Ferguson MR, Rojo DR, von Lindern JJ, O'Brien WA. HIV-1 replication cycle. *Clin Lab Med.* 2002 Sep;22(3):611-35.

Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med.* 1999 May;5(5):512-7.

Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:1-25.

Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Aug;13(8):484-96.

Friedrich B, Li G, Dziuba N, Ferguson MR. Quantitative PCR used to assess HIV-1 integration and 2-LTR circle formation in human macrophages, peripheral blood lymphocytes and a CD4+ cell line. *Virology.* 2010 Dec 3;7:354.

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983 May 20;220(4599):865-7.

Gantner P, Mélard A, Damond F, Delaugerre C, Dina J, Gueudin M, Maillard A, Sauné K, Rodallec A, Tuillon E, Plantier JC, Rouzioux C, Avettand-Fenoel V; ANRS-AC11. Quantification Working Group. Interlaboratory quality control of total HIV-1 DNA load measurement for multicenter reservoir studies. *J Med Virol.* 2017 Nov;89(11):2047-2050.

Garcia JA, Harrich D, Soultanakis E, Wu F, Mitsuyasu R, Gaynor RB. Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. *EMBO J.* 1989 Mar;8(3):765-78.

Gautier VW, Gu L, O'Donoghue N, Pennington S, Sheehy N, Hall WW. In vitro nuclear interactome of the HIV-1 Tat protein. *Retrovirology* 2009;6:47.

Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 1991; 5: 617–637.

German P, Liu HC, Szwarcberg J, Hepner M, Andrews J, Kearney BP, Mathias A. Effect of cobicistat on glomerular filtration rate in subjects with normal and impaired renal function. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2012 Sep 1;61(1):32-40.

Gonzales ME. Vpu Protein: The Viroporin Encoded by HIV-1. *Viruses*. 2015 Aug 4;7(8):4352-68.

Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1981 Dec 10;305(24):1425-31.

Hägglom A, Svedhem V, Singh K, Sönnernborg A, Neogi U. Virological failure in patients with HIV-1 subtype C receiving antiretroviral therapy: an analysis of a prospective national cohort in Sweden. *Lancet HIV*. 2016 Apr;3(4):e166-74.

Han Y, Lassen K, Monie D, Sedaghat AR, Shimoji S, Liu X, Pierson TC, Margolick JB, Siliciano RF, Siliciano JD. Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J Virol*. 2004 Jun;78(12):6122-33.

Han Y, Lin YB, An W, Xu J, Yang HC, O'Connell K, Dordai D, Boeke JD, Siliciano JD, Siliciano RF. Orientation-dependent regulation of integrated HIV-1 expression by host gene transcriptional readthrough. *Cell Host Microbe*. 2008 Aug 14;4(2):134-46.

Haughey NJ, Nath A, Mattson MP, Slevin JT, Geiger JD. HIV-1 Tat through phosphorylation of NMDA receptors potentiates glutamate excitotoxicity. *J Neurochem* 2001;78:457–467.

Hladik F, McElrath MJ 2008. Setting the stage: Host invasion by HIV. *Nat Rev Immunol* 8: 447–457.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995 Jan 12;373(6510):123-6.

Ho TC, Shan L, Hosmane NN, Wang J, Laskey SB, Rosenbloom DIS, Lai J, Blankson JN, Siliciano JD, Siliciano RF. Replication-Competent Noninduced Proviruses in the Latent Reservoir Increase Barrier to HIV-1 Cure. *Cell*. 2013 Oct 24;155(3):540-51.

Hu WS, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Oct 1;2(10).

Huang Y, Mak J, Cao Q, Li Z, Wainberg MA, Kleiman L. Incorporation of excess wild-type and mutant tRNA(3Lys) into human immunodeficiency virus type 1.

INSIGHT START Study Group, Lundgren JD, Babiker AG, Gordin F, Emery S, Grund B, Sharma S, Avihingsanon A, Cooper DA, Fätkenheuer G, Llibre JM, Molina JM, Munderi P, Schechter M, Wood R, Klingman KL, Collins S, Lane HC, Phillips AN, Neaton JD. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med*. 2015 Aug 27;373(9):795-807.

Josefsson L, King MS, Makitalo B, Brännström J, Shao W, Maldarelli F, Kearney MF, Hu WS, Chen J, Gaines H, Mellors JW, Albert J, Coffin JM, Palmer SE. Majority of CD4+ T cells from peripheral blood of HIV-1-infected individuals contain only one HIV DNA molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jul 5;108(27):11199-204.

Kauder SE, Bosque A, Lindqvist A, Planelles V, Verdin E. Epigenetic regulation of HIV-1 latency by cytosine methylation. *PLoS Pathog*. 2009 Jun;5(6):e1000495.

Kim N, Kukkonen S, Gupta S, Aldovini A. Association of Tat with promoters of PTEN and PP2A subunits is key to transcriptional activation of apoptotic pathways in HIV-infected CD4 + T cells. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001103.

Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol*. 1989 Sep;63(9):3708-13.

Kiselinova M, Pasternak AO, De Spiegelaere W, Vogelaers D, Berkhout B, Vandekerckhove L. Comparison of droplet digital PCR and seminested real-time PCR for quantification of cell-associated HIV-1 RNA. *PLoS One*. 2014 Jan 21;9(1):e85999.

Kogan M, Rappaport J. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology*. 2011 Apr 13;8:25.

Krishnan M, Park JM, Cao F, Wang D, Paulmurugan R, Tseng JR, Gonzalgo ML, Gambhir SS, Wu JC. Effects of epigenetic modulation on reporter gene expression: implications for stem cell imaging. *FASEB J*. 2006;20:106–108.

Kudoh A, Takahama S, Sawasaki T, Ode H, Yokoyama M, Okayama A, Ishikawa A, Miyakawa K, Matsunaga S, Kimura H, Sugiura W, Sato H, Hirano H, Ohno S, Yamamoto N, Ryo A. The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology*. 2014 Jan 22;11:9.

Kuppuswamy M, Subramanian T, Srinivasan A, Chinnadurai G. Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* 1989;17:3551–3561.

Lackner AA, Lederman MM, Rodriguez B. HIV pathogenesis: the host. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Sep 1;2(9):a007005.

La Placa, *Principi di microbiologia medica – XIV edizione*, 2014.

Lazzi S, Bellan C, De Falco G, Cinti C, Ferrari F, Nyongo A, Claudio PP, Tosi GM, Vatti R, Gloghini A, Carbone A, Giordano A, Leoncini L, Tosi P. Expression of RB2/ p130 tumor-suppressor gene in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: implications for disease pathogenesis. *Hum Pathol* 2002;33:723–731.

Ledergerber B, Lundgren JD, Walker AS, Sabin C, Justice A, Reiss P, Mussini C, Wit F, d'Arminio Monforte A, Weber R, Fusco G, Staszewski S, Law M, Hogg R, Lampe F, Gill MJ, Castelli F, Phillips AN; PLATO Collaboration. Predictors of trend in CD4-positive T-cell count and mortality among HIV-1-infected individuals with virological failure to all three antiretroviral-drug classes. *Lancet*. 2004 Jul 3-9;364(9428):51-62.

Lenasi T, Contreras X, Peterlin BM. Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell Host Microbe*. 2008 Aug 14;4(2):123-33.

Levy JA, HIV and the Pathogenesis of AIDS – 3rd edition, 2007.

Linee Guida Italiane – edizione 2017. Ministero della salute.
www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2696_allegato.pdf

Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*. 2014 Sep 20;384(9948):1098.

Macías J, Berenguer J, Japón MA, Girón JA, Rivero A, López-Cortés LF, Moreno A, González-Serrano M, Iribarren JA, Ortega E, Miralles P, Mira JA, Pineda JA. Fast fibrosis progression between repeated liver biopsies in patients coinfecting with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus. *Hepatology*. 2009 Oct;50(4):1056-63.

Magiorkinis G, Angelis K, Mamais I, Katzourakis A, Hatzakis A, Albert J, Lawyer G, Hamouda O, Struck D, Vercauteren J, Wensing A, Alexiev I, Åsjö B, Balotta C, Gomes P, Camacho RJ, Coughlan S, Griskevicius A, Grossman Z, Horban A, Kostrikis LG, Lepej SJ, Liitsola K, Linka M, Nielsen C, Otelea D, Paredes R, Poljak M, Puchhammer-Stöckl E, Schmit JC, Sönnernborg A, Staneková D, Stanojevic M, Stylianou DC, Boucher CAB; SPREAD program, Nikolopoulos G, Vasylyeva T, Friedman SR, van de Vijver D, Angarano G, Chaix ML, de Luca A, Korn K, Loveday C, Soriano V, Yerly S, Zazzi M, Vandamme AM, Paraskevis D. The global spread of HIV-1 subtype B epidemic. *Infect Genet Evol*. 2016 Dec;46:169-179.

Mahmoudi T, Parra M, Vries RG, Kauder SE, Verrijzer CP, Ott M, Verdin E. The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter. *J Biol Chem* 2006;281:19960–19968.

Mamede JI, Cianci GC, Anderson MR, Hope TJ. Early cytoplasmic uncoating is associated with infectivity of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Aug 22;114(34):E7169-E7178.

Mandal D, Prasad VR. Analysis of 2-LTR circle junctions of viral DNA in infected cells. *Methods Mol Biol*. 2009;485:73-85.

Marzio G, Tyagi M, Gutierrez MI, Giacca M. HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13519–13524.

Massiah MA, Starich MR, Paschall C, Summers MF, Christensen AM, Sundquist WI. Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Mol Biol.* 1994 Nov 25;244(2):198-223.

Mbisa JL, Delviks-Frankenberry KA, Thomas JA, Gorelick RJ, Pathak VK. Real-time PCR analysis of HIV-1 replication post-entry events. *Methods Mol Biol.* 2009;485:55-72.

Mbonye U, Karn J. Transcriptional control of HIV latency: cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure. *Virology* 2014;454–455:328–339.

Meehan AM, Saenz DT, Morrison JH, Garcia-Rivera JA, Peretz M, Llano M, Poeschla EM. LEDGF/p75 proteins with alternative chromatin tethers are functional HIV-1 cofactors. *PLoS Pathog.* 2009 Jul;5(7):e1000522.

Meng B, Lever AM. Wrapping up the bad news: HIV assembly and release. *Retrovirology.* 2013 Jan 10;10:5.

Mocroft A, Phillips AN, Ledergerber B, Smith C, Bogner JR, Lacombe K, Wiercinska-Drapalo A, Reiss P, Kirk O, Lundgren JD; EuroSIDA Study Group. Estimated average annual rate of change of CD4(+) T-cell counts in patients on combination antiretroviral therapy. *Antivir Ther.* 2010;15(4):563-70.

Muriaux D, Darlix JL. Properties and functions of the nucleocapsid protein in virus assembly. *RNA Biol.* 2010 Nov-Dec;7(6):744-53.

Mussini C, Manzardo C, Johnson M, Monforte Ad, Uberti-Foppa C, Antinori A, Gill MJ, Sighinolfi L, Borghi V, Lazzarin A, Miró JM, Sabin C; Late Presenter Investigators. Patients presenting with AIDS in the HAART era: a collaborative cohort analysis. *AIDS.* 2008 Nov 30;22(18):2461-9.

Musumeci G, Magnani G, Bon I, Longo S, Bertoldi A, Degli Antoni AM, Rossi MR, Ruggeri A, Sambri V, Semprini S, Sighinolfi L, Ursitti MA, Zerbini A, Colangeli V, Calza L, Finarelli AC,

Massimiliani E, Re MC. HIV-1 early and late diagnosis in the Emilia Romagna Region (Italy): a three year study. *New Microbiol.* 2016 Oct;39(4):241-246.

Nath A, Hauser KF, Wojna V, Booze RM, Maragos W, Prendergast M, Cass W, Turchan JT. Molecular basis for interactions of HIV and drugs of abuse. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;31(Suppl 2):S62–S69.

Nicastri E, Tommasi C, Abbate I, Bonora S, Tempestilli M, Bellagamba R, Viscione M, Rozera G, Gallo AL, Ivanovic J, Amendola A, Pucillo L, Di Perri G, Capobianchi MR, Narciso P. Effect of raltegravir on the total and unintegrated proviral HIV DNA during raltegravir-based HAART. *Antivir Ther.* 2011;16(6):797-803.

Niedrig M, Gelderblom HR, Pauli G, Marz J, Bickhard H, Wolf H, Modrow S. Inhibition of infectious human immunodeficiency virus type 1 particle formation by Gag protein-derived peptides. *J Gen Virol* 1994; 75: 1469–1474.

Okulicz JF, Lambotte O. Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers.

Pace MJ, Graf EH, O'Doherty U. HIV 2-long terminal repeat circular DNA is stable in primary CD4+T Cells. *Virology.* 2013 Jun 20;441(1):18-21.

Parisi SG, Andreis S, Mengoli C, Scaggiante R, Ferretto R, Manfrin V, Cruciani M, Giobbia M, Boldrin C, Basso M, Andreoni M, Palù G, Sarmati L. Baseline cellular HIV DNA load predicts HIV DNA decline and residual HIV plasma levels during effective antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol.* 2012 Feb;50(2):258-63.

Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *AIDS* 1999; 13(suppl A):S137–S162.

Pereira EA, daSilva LL. HIV-1 Nef: Taking Control of Protein Trafficking. *Traffic.* 2016 Sep;17(9):976-96.

Perelson AS, Essunger P, Ho DD. Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo. *AIDS.* 1997;11 Suppl A:S17-24.

Pinzone MR, O'Doherty U. Measuring integrated HIV DNA ex vivo and in vitro provides insights about how reservoirs are formed and maintained. *Retrovirology.* 2018; 15: 22.

Procopio FA, Fromentin R, Kulpa DA, Brehm JH, Bebin AG, Strain MC, Richman DD, O'Doherty U, Palmer S, Hecht FM, Hoh R, Barnard RJ, Miller MD, Hazuda DJ, Deeks SG, Sékaly RP, Chomont N. A Novel Assay to Measure the Magnitude of the Inducible Viral Reservoir in HIV-infected Individuals. *EBioMedicine*. 2015 Jun 27;2(8):874-83.

Pryciak PM, Varmus HE. Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell*. 1992 May 29;69(5):769-80.

Raimondo M, Camoni L, Urcioli R, CARPHA Study Group. Second national census among people diagnosed with HIV and in care in Italy in 2014. *ICAR 2016*, Abs 82.

Rausch JW, Le Grice SF. HIV Rev Assembly on the Rev Response Element (RRE): A Structural Perspective. *Viruses*. 2015 Jun 12;7(6):3053-75.

Rodriguez-Penney AT, Iudicello JE, Riggs PK, Doyle K, Ellis RJ, Letendre SL, Grant I, Woods SP; HIV Neurobehavioral Research Program HNRP Group. Co-morbidities in persons infected with HIV: increased burden with older age and negative effects on health-related quality of life. *AIDS Patient Care STDS*. 2013 Jan;27(1):5-16.

Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R, Haseltine WA, Rosen CA. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* 1989;63:1-8.

Sadiq SK, Noé F, De Fabritiis G. Kinetic characterization of the critical step in HIV-1 protease maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Dec 11;109(50):20449-54.

Schackman BR, Fleishman JA, Su AE, Berkowitz BK, Moore RD, Walensky RP, Becker JE, Voss C, Paltiel AD, Weinstein MC, Freedberg KA, Gebo KA, Losina E. The lifetime medical cost savings from preventing HIV in the United States. *Med Care*. 2015 Apr;53(4):293-301.

Schröder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002 Aug 23;110(4):521-9.

Serrano-Villar S, Sainz T, Lee SA, Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, Ferre AL, Hayes TL, Somsouk M, Hsue PY, Van Natta ML, Meinert CL, Lederman MM, Hatano H, Jain V, Huang Y, Hecht FM, Martin JN, McCune JM, Moreno S, Deeks SG. HIV-infected individuals with low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets,

heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS Pathog.* 2014 May 15;10(5):e1004078.

Sharaf RR, Li JZ. The Alphabet Soup of HIV Reservoir Markers. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2017 Apr;14(2):72-81.

Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; 1: 006841.

Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, Kovacs C, Gange SJ, Siliciano RF. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):727-8.

Siliciano JD, Siliciano RF. Enhanced culture assay for detection and quantitation of latently infected, resting CD4+ T-cells carrying replication-competent virus in HIV-1-infected individuals. *Methods Mol Biol.* 2005; 304():3-15.

Singh A, Razooky B, Cox CD, Simpson ML, Weinberger LS. Transcriptional bursting from the HIV-1 promoter is a significant source of stochastic noise in HIV-1 gene expression. *Biophys J.* 2010 Apr 21;98(8):L32-4.

Sloan RD, Wainberg MA. The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology.* 2011 Jul 1;8:52.

Strain MC, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Smith DM, Leigh-Brown AJ, Macaranas TR, Lam RY, Daly OA, Fischer M, Opravil M, Levine H, Bachelier L, Spina CA, Richman DD, Wong JK. Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: intrinsic stability predicts lifelong persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 15;100(8):4819-24.

Svicher V, Ceccherini-Silberstein F, Antinori A, Aquaro S, Perno CF. Understanding HIV compartments and reservoirs. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2014 Jun;11(2):186-94.

Swanstrom R, Coffin J. HIV-1 pathogenesis: the virus. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Dec 1;2(12):a007443.

Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jul;2(7):a006924.

Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008;358: 1590–1602.

Tedbury PR, Freed EO. The role of matrix in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation. *Trends Microbiol.* 2014 Jul;22(7):372-8.

TEMPRANO ANRS 12136 Study Group, Danel C, Moh R, Gabillard D, Badje A, Le Carrou J, Ouassa T, Ouattara E, Anzian A, Ntakpé JB, Minga A, Kouame GM, Bouhoussou F, Emieme A, Kouamé A, Inwoley A, Toni TD, Ahiboh H, Kabran M, Rabe C, Sidibé B, Nzunetu G, Konan R, Gnokoro J, Gouesse P, Messou E, Dohoun L, Kamagate S, Yao A, Amon S, Kouame AB, Koua A, Kouamé E, Ndri Y, Ba-Gomis O, Daligou M, Ackoundzé S, Hawerlander D, Ani A, Dembélé F, Koné F, Guéhi C, Kanga C, Koule S, Séri J, Oyebi M, Mbakop N, Makaila O, Babatunde C, Babatounde N, Bleoué G, Tchoutedjem M, Kouadio AC, Sena G, Yededji SY, Assi R, Bakayoko A, Mahassadi A, Attia A, Oussou A, Mobio M, Bamba D, Koman M, Horo A, Deschamps N, Chenal H, Sassan-Morokro M, Konate S, Aka K, Aoussi E, Journot V, Nchot C, Karcher S, Chaix ML, Rouzioux C, Sow PS, Perronne C, Girard PM, Menan H, Bissagnene E, Kadio A, Ettiegne-Traore V, Moh-Semdé C, Kouame A, Massumbuko JM, Chêne G, Dosso M, Domoua SK, N'Dri-Yoman T, Salamon R, Eholié SP, Anglaret X. A Trial of Early Antiretrovirals and Isoniazid Preventive Therapy in Africa. *N Engl J Med.* 2015 Aug 27;373(9):808-22.

Tryoen-To' th P, Chasserot-Golaz S, Tu A, Gherib P, Bader MF, Beaumelle B, Vitale N. HIV-1 Tat protein inhibits neurosecretion by binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Cell Sci* 2013;126:454–463.

Treskova M, Kuhlmann A, Bogner J, Hower M, Heiken H, Stellbrink HJ, Mahlich J, Schulenburg JM, Stoll M. Analysis of contemporary HIV/AIDS health care costs in Germany: Driving factors and distribution across antiretroviral therapy lines. *Medicine (Baltimore).* 2016 Jun;95(26):e3961.

UNAIDS DATA 2018, <http://www.unaids.org/en/resources/documents/2018/unaids-data-2018>.

Van Lint C, Bouchat S, Marcello A. HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* 2013;10:67.

Verdin E, Paras P Jr, Van Lint C. Chromatin disruption in the promoter of human immunodeficiency virus type 1 during transcriptional activation. *EMBO J*. 1993 Aug;12(8):3249-59.

Ward AB, Wilson IA. Insights Into the Trimeric HIV-1 Envelope Glycoprotein Structure. *Trends Biochem Sci*. 2015 February ; 40(2): 101–107.

Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS, Shaw GM. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. 1995 Jan 12;373(6510):117-22.

Weinberger LS, Burnett JC, Toettcher JE, Arkin AP, Schaffer DV. Stochastic gene expression in a lentiviral positive-feedback loop: HIV-1 Tat fluctuations drive phenotypic diversity. *Cell*. 2005 Jul 29;122(2):169-82.

Weinberger AD, Weinberger LS. Stochastic fate selection in HIV-infected patients. *Cell*. 2013 Oct 24;155(3):497-9.

Widłak P, Garrard WT. Nucleosomes and regulation of gene expression. Structure of the HIV-1 5'LTR. *Acta Biochim Pol*. 1998;45(1):209-19.

Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Aug; 2(8): a006866.

Williams SA, Chen LF, Kwon H, Ruiz-Jarabo CM, Verdin E, Greene WC. NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J*. 2006 Jan 11;25(1):139-49.

Williams JP, Hurst J, Stöhr W, Robinson N, Brown H, Fisher M, Kinloch S, Cooper D, Schechter M, Tambussi G, Fidler S, Carrington M, Babiker A, Weber J, Koelsch KK, Kelleher AD, Phillips RE, Frater J. HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control. *eLife*. 2014; 3: e03821.

Winston JA, Bruggeman LA, Ross MD, Jacobson J, Ross L, D'Agati VD, Klotman PE, Klotman ME. Nephropathy and establishment of a renal reservoir of HIV type 1 during primary infection. *N Engl J Med*. 2001 Jun 28;344(26):1979-84.

Wu Y, Marsh JW. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegration HIV DNA. *Science*. 2001;293:1503–6.

Yerly S, Günthard HF, Fagard C, Joos B, Perneger TV, Hirschel B, Perrin L; Swiss HIV Cohort Study. Proviral HIV-DNA predicts viral rebound and viral setpoint after structured treatment interruptions. *AIDS*. 2004 Sep 24;18(14):1951-3.

Yoder KE, Fishel R. PCR-based detection is unable to consistently distinguish HIV 1LTR circles.

Zhao G, Perilla JR, Yufenyuy EL, Meng X, Chen B, Ning J, Ahn J, Gronenborn AM, Schulten K, Aiken C, Zhang P. Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature*. 2013 May 30;497(7451):643-6.

Zhao RY, Li G, Bukrinsky MI. Vpr-host interactions during HIV-1 viral life cycle. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2011 Jun;6(2):216-29.

Zhou Y, Zhang H, Siliciano JD, Siliciano RF. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4+ T cells. *J Virol*. 2005 Feb;79(4):2199-210.