



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA
XXIV CICLO

**ANALISI DEL CONTRIBUTO DELLE
POLIPROTEINE GAG E POL
NELLO SVILUPPO DELLA RESISTENZA
IN PAZIENTI HIV-1 POSITIVI
SOTTOPOSTI A TERAPIA ANTIRETROVIRALE**

DIRETTORE DELLA SCUOLA: **CH.MO PROF. GIORGIO PALÙ**

SUPERVISORE: **CH.MA PROF.SSA MARIA CRISTINA PAROLIN**

DOTTORANDA: **DOTT.SSA ILARIA CARLI**

INDICE

1. SOMMARIO	pag. 1
2. ABSTRACT	pag. 5
3. INTRODUZIONE	pag. 7
3.1. Il virus dell'Immunodeficienza Umana	pag. 7
3.1.1. La struttura della particella virale	pag. 10
3.1.2. Organizzazione del genoma e meccanismi di regolazione dell'espressione genica	pag. 14
3.1.3. Il ciclo replicativo di HIV-1	pag. 19
3.2. La patogenesi dell'infezione da HIV-1 e la terapia farmacologica	pag. 23
3.2.1. Caratteristiche cliniche dell'infezione	pag. 23
3.2.2. Strategie per il controllo dell'infezione	pag. 25
3.2.3. I meccanismi molecolari della farmaco resistenza	pag. 28
3.2.4. Il ruolo di Gag nei processi di resistenza	pag. 32
4. SCOPO	pag. 35
5. MATERIALI E METODI	pag. 37
5.1. Materiali	pag. 37
5.1.1. Plasmidi	pag. 37
5.1.2. Linee cellulari	pag. 38
5.1.3. Oligonucleotidi	pag. 39
5.2. Metodi	pag. 43
5.2.1. Quantificazione degli acidi nucleici	pag. 43
5.2.2. Estrazione dell'RNA virale da plasma di pazienti HIV-1 positivi	pag. 43
5.2.3. Analisi genotipica dei campioni HIV-1 positivi	pag. 44
5.2.4. Predizione della suscettibilità ai farmaci antiretrovirali ed analisi del sottotipo	pag. 45

5.2.5. Reazioni di retrotrascrizione ed amplificazione dell'intero gene <i>gag</i>	pag. 45
5.2.6. Reazioni di retrotrascrizione ed amplificazione della regione del gene <i>env</i> codificante la gp41	pag. 47
5.2.7. Sequenziamento dei prodotti di PCR e dei plasmidi	pag. 48
5.2.8. Restrizioni enzimatiche	pag. 49
5.2.9. Competenza e trasformazione batterica	pag. 50
5.2.10. Preparazione di DNA plasmidico	pag. 51
5.2.11. Tecniche di clonaggio	pag. 52
5.2.11.1 Schema sperimentale della strategia di clonaggio delle regioni 5' e 3' dei geni <i>gag</i> derivate da pazienti nel vettore pSVC21vpr ⁺ vpu ⁺ nef ⁺ rev ⁻ Δenv-CAT derivato da HIV-1	pag. 53
5.2.11.2. Ottenimento del costrutto esprimente la regione 5' <i>gag</i> derivata dal paziente in un contesto provirale	pag. 55
5.2.12. Tecniche di trasfezione	pag. 57
5.2.13. Preparazione dei lisati cellulari per l'analisi mediante Western Blotting	pag. 58
5.2.14. Saggio di quantificazione degli estratti cellulari	pag. 58
5.2.15. Produzione di particelle lenti virali	pag. 59
5.2.16. Saggio di attività retrotrascrittasi (<i>RT assay</i>)	pag. 59
5.2.17. Purificazione delle VLPs mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio (<i>virion pelleting</i>)	pag. 60
5.2.18. Elettroforesi denaturante di proteine (SDS-PAGE)	pag. 61
5.2.19. Western Blotting	pag. 62
5.2.20. Allestimento della coltura cellulare primaria di macrofagi	pag. 63
5.2.21. Analisi citofluorimetrica	pag. 63
5.2.22. Saggio di infettività delle particelle (<i>CAT assay</i>)	pag. 64

6. RISULTATI **pag. 67**

6.1. Premessa	pag. 67
6.2. Analisi genotipica del gene <i>gag</i> in pazienti HIV-1 positivi	pag. 69
6.3. Profili di resistenza di PR e RT in campioni HIV-1 positivi di pazienti in fallimento terapeutico	pag. 71

6.4. Analisi genotipica del gene <i>gag</i> nei pazienti HIV-1 positivi che hanno fallito la terapia antiretrovirale	pag. 73
6.5. Sistema sperimentale per l'analisi del ruolo delle regioni N- e C-terminali della proteina Pr55Gag derivate da pazienti sul ciclo replicativo di HIV-1	pag. 79
6.6. Analisi del ruolo della regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente sul ciclo replicativo del virus	pag. 80
6.6.1. Produzione di virioni HIV-1 ricombinanti che esprimono la regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente	pag. 80
6.6.2. Attività retrotrascrittivica dei virioni ricombinanti esprimenti la regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente	pag. 82
6.6.3. Rilascio di particelle virali esprimenti la regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente	pag. 83
6.6.4. Analisi del profilo di processamento da parte della proteasi <i>wild type</i> del precursore Pr55Gag contenente il sito di taglio MA/CA derivato da paziente	pag. 88
6.6.5. Analisi dell'infettività delle particelle virali esprimenti la regione N-terminale di Pr55Gag derivata dal paziente	pag. 91
6.6.6. Analisi genotipica della glicoproteina dell' <i>envelope</i> di HIV-1 gp41 nel paziente analizzato	pag. 94
7. DISCUSSIONE	pag. 97
8. BIBLIOGRAFIA	pag. 107

1. SOMMARIO

L'introduzione della *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART) a metà degli anni Novanta per la cura dell'AIDS ha fortemente ridotto la morbosità e la mortalità ad essa associate e sensibilmente esteso l'aspettativa e la qualità della vita dei pazienti HIV-1 positivi. Attualmente sono più di 20 gli inibitori approvati per l'uso clinico e sono in grado di agire negativamente in diverse fasi del ciclo replicativo virale, quali l'ingresso del virus nella cellula ospite (antagonisti dei corecettori ed inibitori di fusione), la retrotrascrizione (inibitori nucleosidici, NRTIs, e non nucleosidici, NNRTIs, della retrotrascrittasi) e l'integrazione del genoma virale (inibitori dell'integrasi) ed il processo di maturazione della particella virale (inibitori della proteasi, PIs). Le attuali Linee Guida raccomandano strategie terapeutiche che prevedono la combinazione di farmaci appartenenti ad almeno due classi distinte, generalmente due NRTIs in associazione ad un PI o un NNRTI, considerati lo *standard of care* per il trattamento dell'infezione da HIV-1. Nonostante il successo dell'approccio combinatorio, il maggior fattore che contribuisce al fallimento terapeutico rimane lo sviluppo di resistenze. La perdita di sensibilità ai farmaci è dovuta principalmente all'insorgenza di mutazioni che alterano il sito di legame degli enzimi virali agli inibitori (Menéndez-Arias, 2010). Attualmente, molte di queste mutazioni, definite mutazioni di resistenza, sono ben caratterizzate (Johnson *et al.*, 2010) e vengono utilizzate nei test genotipici di *routine* per identificare le cause del fallimento terapeutico, anche se in alcuni casi queste informazioni non sono sufficienti a spiegare il quadro clinico osservato.

Studi recenti indicano che, oltre alle sequenze codificanti gli enzimi virali bersaglio della terapia, altre regioni del genoma virale possono contribuire allo sviluppo di resistenze. In particolare, la perdita di attività catalitica della proteasi dovuta alle mutazioni di resistenza può essere compensata da sostituzioni amminoacidiche presenti nelle vicinanze o a livello dei siti di taglio in Gag (Parry *et al.*, 2009; Dam *et al.*, 2009; Nijhuis *et al.*, 2007), così come da sostituzioni a carico del segnale di scorrimento dei ribosomi tra i geni *gag* e *pol* (Doyon *et al.*, 1998), che favoriscono il processamento dei precursori poliproteici virali. Inoltre,

alcuni residui della retrotrascrittasi sembrano svolgere un ruolo critico nella corretta regolazione della maturazione dei precursori Gag e Gag-Pol (Nishitsuji *et al.*, 2011; Chiang *et al.*, 2012).

Sebbene sia aumentata la consapevolezza della rilevanza che hanno altri domini proteici di HIV-1, oltre agli enzimi PR ed RT, nella predizione ed acquisizione delle farmacoresistenze, non sono ancora chiarite le ricadute funzionali che tali specifici mutazioni hanno nel ciclo biologico del virus. Inoltre, i dati disponibili non sono ancora unanimi nel definire l'importanza relativa di ciascuna regione analizzata, ad esempio nella proteina Gag (Dam *et al.*, 2009; Parry *et al.*, 2007).

In tale contesto, abbiamo voluto investigare il ruolo svolto dalla proteina Gag come substrato naturale della proteasi virale ed il suo contributo nei meccanismi di resistenza. Sono state quindi ottimizzate le condizioni di amplificazione e di sequenziamento del gene *gag* a partire da isolati virali di diverso sottotipo. In collaborazione con il Professor Parisi, Università degli Studi di Padova, sono stati selezionati dei pazienti HIV-1 positivi che hanno fallito il trattamento terapeutico basato su PIs e RTIs all'interno della coorte Veneta CAVeAT, comprensiva di cinque Unità di Malattie Infettive. Di ciascuno di questi sono stati analizzati i profili di resistenza e le sequenze del gene *gag* per identificare le posizioni variabili. Allo scopo di determinare il contributo della proteina Pr55Gag nei meccanismi di resistenza e la sua specifica funzione nel ciclo biologico del virus, è stata disegnata una strategia di clonaggio che permette di analizzare il contributo differenziale della regione ammino- o carbossi-terminale di Gag in presenza o in assenza degli enzimi PR-RT mutati. Con questo sistema ciascun prodotto di amplificazione ottenuto dall'RNA estratto dal paziente può essere inserito direttamente nel genoma provirale di HIV-1. Nello specifico, è stato utilizzato un sistema di *trans*-complementazione dell'*envelope*, sviluppato in precedenza nel nostro laboratorio, che permette la pseudotipizzazione con *envelope* eterologhi espressi *in trans* di virioni competenti per un solo ciclo replicativo. Tra tutti i pazienti analizzati, è stato scelto di analizzare l'effetto di specifiche mutazioni a carico della regione N-terminale di Gag di quello che presentava un'unica mutazione di resistenza in PR. Dai risultati ottenuti è emerso che: (i) la presenza della regione N-terminale derivata dal paziente porta ad un aumento dell'attività retrotrascrittasi e del contenuto di p24 nel suranante delle cellule utilizzate per

la produzione dei virioni ricombinanti rispetto a quanto osservato nel virus *wild type*; (ii) nel sistema utilizzato la sequenza amminoacidica del sito di taglio MA/CA derivata dal paziente non sembra influenzare l'accessibilità del sito per la proteasi *wild type*; (iii) le mutazioni a carico della regione N-terminale di Gag derivata dal paziente riducono l'infettività dei virioni ricombinanti che la esprimono.

Nel complesso, i risultati ottenuti possono contribuire a caratterizzare le relazioni funzionali che intercorrono tra Gag e gli enzimi PR ed RT nei meccanismi di resistenza e nel ciclo biologico del virus.

2. ABSTRACT

The introduction in the mid 1990s of Antiretroviral Therapy in the cure of AIDS has dramatically decreased the morbidity and mortality rate and has significantly extended the lifespan and the quality of life of HIV-1 positive patients. Today there are more than 20 drugs licensed for clinical use, targeting different steps of viral life cycle including viral entry (coreceptor antagonists and fusion inhibitors), reverse transcription (nucleoside, NRTIs, and non-nucleoside inhibitors, NNRTIs, of the viral reverse transcriptase), integration (integrase inhibitors) and viral maturation (protease inhibitors, PIs). Current Guidelines recommend the use of combination therapies, including drugs of almost two classes, in particular one or two NRTIs and one NNRTIs or one PIs, those are considered the standard of care for the treatment of HIV infection. Despite the success of pharmacological combination strategy, the emergence of drug resistance is still a major factor contributing to the therapy failure.

The mechanisms of resistance mainly involve mutations directly altering the interaction of viral enzymes and inhibitors (Menéndez-Arias, 2010). Nowadays, most of these mutations, defined drug resistance mutations, are well characterized (Johnson *et al.*, 2010) and are used in standard genotypic tests as predictive clues of treatment failure, but in some cases such limited information is not sufficient to explain the virological failure.

Emerging studies reveal that, besides the ones encoding Gag and Pol polyproteins, other regions might contribute to the development of resistance. In particular, some specific cleavage sites and non-cleavage site mutations (Ho *et al.*, 2008; Parry *et al.*, 2009; Dam *et al.*, 2009; Nijhuis *et al.*, 2007), as well as frameshift-regulating site mutations in Gag (Doyon *et al.*, 1998), increase cleavage sites accessibility and polyprotein processing, thus compensating for the catalytic loss of function of the viral Protease (PR) induced by primary resistance mutations. Moreover, some residues in the HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) are critical for proteolytic processing of Gag-Pol precursors (Nishitsuji *et al.*, 2011; Chiang *et al.*, 2012).

Although the augmenting consciousness of the relevance of other viral protein domains, besides PR and RT enzymes, in the prediction and acquisition of

resistance to the antiviral formulations, little is known about the function of such specific mutations in the viral life cycle. Moreover, the available data are not unanimous in defining the relative importance of each analyzed region, for example within the Gag protein (Dam *et al.*, 2009; Parry *et al.*, 2007).

In this context, we are interested in studying the functional role of HIV-1 Pr55Gag protein as natural substrates of PR and its contribution in resistance mechanisms. We optimized PCR amplification experimental settings and sequencing conditions of the *gag* gene from clinical isolates of different subtypes. In collaboration with Professor Parisi, University of Padua, we analyzed the *gag* sequence derived from clinical samples of HIV-1 infected patients failing PR Inhibitors (PIs) and RT Inhibitors (RTIs), selected among a cohort of five infectious diseases units located in Veneto in Northeastern Italy. In order to determine the contribution of the Pr55Gag protein to the resistance mechanisms and its specific function in the viral life cycle, we designed a cloning strategy that allows to analyze the differential contribution of N-terminal and/or C-terminal regions of Gag in the presence or in the absence of the mutated PR-RT. Indeed, each patient derived PCR products could be inserted in an HIV-1 proviral genome. In particular, we used a modified version of the previously described *env*-complementation system, in which an *env*-deleted provirus expresses a reporter gene under the transcriptional control of the viral LTR and it is capable of one single round of replication. The HIV-1 envelope glycoprotein is given *in trans* along with the Rev protein. Among all the patient samples sequenced so far, we selected one characterized by resistant mutations only in the PR coding region to analyze the effect of the mutated N-terminal region of Pr55Gag protein. Our results indicated that: (i) the patient-derived mutations in the N-terminal region of Pr55Gag enhance the RT activity and the p24 content in the supernatant of producing cells in comparison to the wild type context; (ii) the patient-derived MA/CA cleavage site amino acid sequence doesn't affect the processing ability of the wild type PR; (iii) the infectivity of virions carrying the patient-derived N-terminal region of Pr55Gag is reduced. Our results would contribute to better characterize the role of Gag and the relations with PR and RT in resistance development, their relevance in viral replication and evolution in the presence or in the absence of drugs.

3. INTRODUZIONE

3.1. Il Virus dell'Immunodeficienza Umana

Il Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 (HIV-1) è un Retrovirus appartenente alla sottofamiglia dei Lentivirus. Come tutti i Retrovirus è caratterizzato da un genoma costituito da due molecole di RNA lineare a polarità positiva, non direttamente riconosciute come RNA messaggero, che vengono retroscritte in un doppio filamento di DNA lineare ad opera della trascrittasi inversa virale e successivamente integrate nel genoma della cellula ospite. I Retrovirus sono stati isolati in molti vertebrati e vengono associati a molti tipi di patologie che spaziano da forme tumorali, alterazioni del sistema immunitario a forme neurologiche di tipo degenerativo. Della famiglia *Retroviridae* fanno parte tre sottofamiglie: *Oncovirinae*, *Lentivirinae* e *Spumavirinae*. Recentemente la *International Committee on Taxonomy of Viruses* ha proposto una nuova classificazione dei Retrovirus sulla base del tropismo e della patogenicità. Tra i 7 generi si distinguono: Retrovirus semplici come gli alfaretrovirus, i betaretrovirus e i gammaretrovirus, e Retrovirus complessi, come i deltaretrovirus, gli epsilonretrovirus, i lentivirus e gli spumavirus. HIV è in grado di instaurare un'infezione persistente che determina disordini cronico-degenerativi a carico del sistema immunitario e nervoso, caratterizzati da una progressione molto lenta e come tale viene incluso nella sottofamiglia *Lentiviridae*. Si distinguono due sottotipi di HIV: HIV di tipo 1 e HIV di tipo 2, che differiscono tra loro in termini sierologico-epidemiologici. Della prima sottofamiglia (HIV-1) fanno parte anche virus animali come FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*) e SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*).

Sulla base delle caratteristiche genetiche dell'isolato virale, si possono distinguere tre gruppi di HIV-1: M (Major), O (Outier) e N (non M e non O). Il gruppo M comprende più del 95% dei ceppi circolanti e viene ulteriormente distinto in nove sottotipi: A, B, C, D, F, G, H, J e K che presentano differenze genetiche superiori al 25% a carico dei geni virali *gag* ed *env* ed una differente distribuzione geografica (figura 3.1.):

- il sottotipo A (suddiviso in A1 ed A2) prevale in Africa centro-occidentale,
- il sottotipo B è maggiormente presente in Europa, Nord America ed Australia,
- il sottotipo C è diffuso in Africa sud-orientale, India, Nepal e Cina,
- il sottotipo D è limitato a casi sporadici nella zona centro-orientale dell'Africa,
- il sottotipo F è distribuito in Africa centrale, Sud America ed Europa orientale,
- il sottotipo G è presente in Africa, Russia ed Europa centrale,
- il sottotipo H è circoscritto all'Africa centrale,
- il sottotipo K circola in Congo e Cameroon.

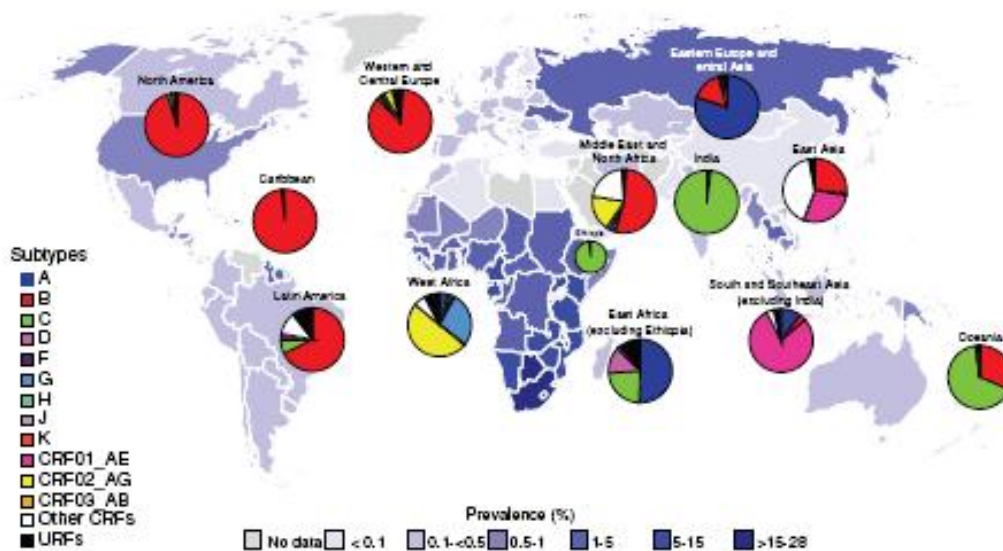


Figura 3.1. Rappresentazione della distribuzione globale dei sottotipi e della prevalenza di HIV-1 nei diversi paesi del mondo (da Skar *et al.*, 2011).

Le Forme Genetiche Ricombinanti (CFRs, *Circulating Recombinant Forms*) sono le varianti virali ricombinanti di maggior interesse epidemiologico e ad oggi ne sono state identificate più di 40 forme diverse (<http://www.hiv.lanl.gov>). I sottotipi A, B, C, D ed i ricombinanti CRF-01AE e CRF-02AG sono responsabili di più del 90% delle infezioni al mondo (<http://www.unaids.org>).

All'interno del gruppo O vengono distinti cinque sottotipi, I, II, III, IV e V, e rappresentano il 25% dei ceppi virali circolanti in Cameroon.

Il gruppo N è dal punto di vista della sequenza genetica il più simile a SIV, da cui HIV-1 evolutivamente deriva, rispetto i virus appartenenti ai gruppi M ed O.

La variabilità genetica di HIV è in grado di influenzare le modalità di trasmissione dell'infezione e di interazione tra il virus e la cellula bersaglio, l'andamento clinico dell'infezione e la risposta ai trattamenti farmacologici.

3.1.1. La struttura della particella virale

La particella virale matura di HIV-1 è di forma sferico-elissoidale con diametro di 100-125 nm. Nella struttura si possono distinguere una regione lipidica esterna, l'*envelope*, che avvolge un core proteico centrale, il nucleocapside, in cui è contenuto il genoma (figura 3.2.) (Coffin, 1996).

L'*envelope* è costituito da un doppio strato fosfolipidico, di derivazione cellulare, arricchito in particolari tipi di lipidi (Lorizate *et al.*, 2013), sul quale si inseriscono due glicoproteine virus-specifiche che si assemblano in forma eterodimerica: la subunità transmembrana ha un peso molecolare di 41 kD (gp41) e la subunità esterna di 120 kD è altamente glicosilata (gp120) (Brügger *et al.*, 2006; White *et al.*, 2010). La gp120 riveste un ruolo fondamentale nell'ingresso del virus nella cellula ospite, mediante il riconoscimento specifico della molecola CD4, il recettore di HIV-1, sulla superficie della cellula bersaglio (Wilén *et al.*, 2012). Oltre alle glicoproteine virali, l'*envelope* contiene altre proteine che vengono acquisite dalla membrana della cellula ospite durante il processo di gemmazione del virus (Esser *et al.*, 2001).

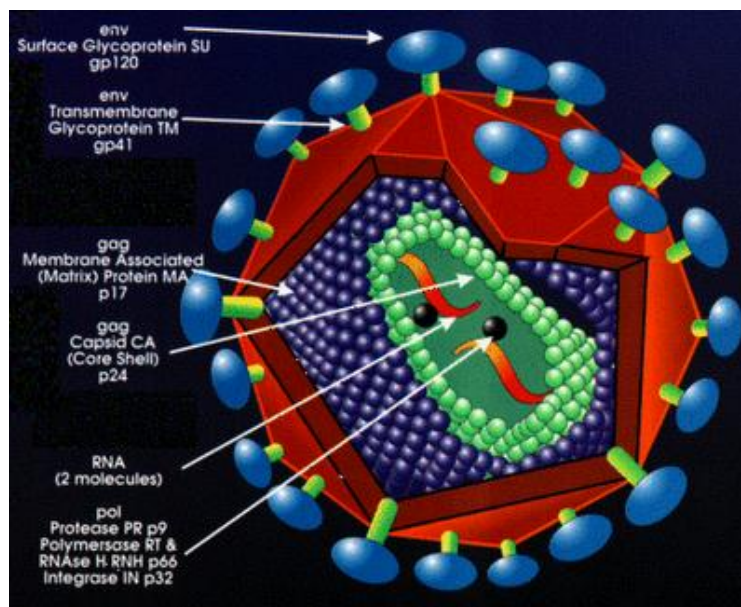


Figura 3. 2. Immagine rappresentativa della struttura della particella virale matura di HIV-1.

La matrice proteica che sottende all'*envelope* è costituita dall'associazione di trimeri della proteina di matrice, p17 o MA, che riveste un ruolo di vitale importanza per l'integrità e l'infettività del virus (Hill *et al.*, 1996). In particolare, durante l'assemblaggio della particella, MA svolge un ruolo fondamentale nel veicolare i precursori strutturali virali alla membrana plasmatica della cellula ospite, nella loro incorporazione nel virione nascente e nel garantire la corretta incorporazione delle glicoproteine di superficie nel virione maturo (Chukkapalli *and* Ono, 2011). Il capsido, a simmetria icosaedrica, è formato dall'associazione di diverse unità proteiche (p24 o CA), dette capsomeri (Briggs *et al.*, 2006).

Al suo interno è racchiuso il genoma virale associato alla proteina del nucleocapside (p7 o NC) ed alle proteine enzimatiche del virus, quali:

- la proteasi (PR), che catalizza il processo di maturazione della particella virale attraverso il taglio proteolitico dei precursori poliproteici virali. L'enzima è attivo in forma omodimerica (ciascuna subunità è costituita da 99 amminoacidi) ed appartiene alla famiglia delle aspartil proteasi (Loeb *et al.*, 1989). Sia l'attivazione che l'attività della proteasi virale sono finemente regolati. Infatti, solo in seguito a dimerizzazione, la proteasi catalizza *in cis* la sua corretta maturazione e può quindi dare il via al processamento dei precursori poliproteici virali in modo temporalmente ordinato grazie alla diversa affinità con cui riconosce specifici siti di taglio in essi presenti (figura 3.4.) (Pettit *et al.*, 2005). La serie ordinata di eventi catalitici è responsabile dei riarrangiamenti strutturali a livello del virione neoformato che portano alla maturazione della particella virale (figura 3.6.) (Bell *and* Lever, 2012) e degli enzimi replicativi;
- la trascrittasi inversa (RT, *Reverse Transcriptase*), una DNA polimerasi RNA-dipendente, che sintetizza una molecola di DNA lineare a doppio filamento su stampo di ciascuna delle due copie di RNA genomico virale (Le Grice, 1993). La RT è attiva in forma eterodimerica ed è composta da una subunità di 66 kDa (p66) e da una subunità di 51 kDa (p51), entrambe prodotte a partire dallo stesso precursore proteico (Pr160): p51 si forma quando dall'estremità carbossi-terminale di p66 viene rimossa per taglio proteolitico una porzione di 15 kDa corrispondente al dominio della RNasi H (Herschhorn *and* Hizi, 2010). Nella regione di dimerizzazione è

presente il sito catalitico della trascrittasi inversa. La sintesi del DNA avviene a partire da un tRNA *primer* di origine cellulare che viene selettivamente incorporato all'interno del virione. A mano a mano che lo stampo ad RNA viene copiato, il dominio dell'RNasi H procede alla sua degradazione (Davies *et al.*, 1991). La retrotrascrizione si conclude grazie alla precisa coordinazione di eventi di sintesi-degradazione ed associazione-disassociazione sullo stampo ad RNA che avvengono all'interno di un complesso multiproteico detto *Reverse Transcription Complex* (RTC), di cui fanno parte sia fattori virali sia cellulari. La mancanza di attività 3'→5' esonucleasica che caratterizza la RT è responsabile di un alto tasso di mutazione (da 10⁻⁴ a 10⁻⁵ sostituzioni per nucleotide per ciclo di replicazione) a carico del DNA neo-sintetizzato. A questo si associano l'elevato tasso di replicazione (10⁷ cicli replicativi pari a 10⁹ particelle virali prodotte al giorno in pazienti infetti) (Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995) e la frequente ricombinazione fra genomi virali copresenti nella stessa cellula o all'interno dello stesso virione. L'associazione di questi fattori è la causa dell'elevata variabilità genetica che caratterizza la popolazione virale che può essere presente anche in un unico paziente, nel quale si possono identificare vere e proprie quasispecie virali (Coffin, 1995; Mansky *and* Temin, 1995; Domingo *et al.*, 1999);

- l'integrasi (IN), proteina di 32 kDa (288 amminoacidi), è richiesta per l'integrazione del DNA provirale nel genoma della cellula ospite (Masuda *et al.*, 1995; Brown, 1997) ed è costituita da tre domini funzionali: il core catalitico, la regione ammino-terminale ed il dominio carbossi-terminale. L'integrasi catalizza due reazioni sequenziali: il processamento dell'estremità 3' del DNA retrotrascritto e lo *strand transfer*. Durante la prima reazione l'integrasi in forma dimerica rimuove un dinucleotide da ciascuna delle due estremità del DNA provirale, generando estremità idrossiliche altamente reattive. Questo avviene all'interno del *Pre Integration Complex* (PIC), un complesso nucleoproteico di proteine virali e cellulari che attraverso i pori nucleari entra all'interno del nucleo della cellula bersaglio. In questa seconda fase l'integrasi in forma tetramerica accompagna l'attacco nucleofilo e la reazione di transesterificazione che

avvengono tra le estremità idrossiliche del DNA virale ed il DNA genomico della cellula ospite, portando alla completa integrazione del provirus. Il dominio carbossi-terminale conferisce la capacità di legare sia il DNA virale sia quello cellulare, mentre il nel dominio ammino-terminale è presente un motivo *zinc-finger* il cui contributo non è ancora ben chiarito.

Le due molecole di RNA a singolo filamento a polarità positiva che costituiscono il genoma virale sono lunghe circa 9.0 kpb nucleotidi ciascuna e sono legate tra loro in configurazione antiparallela all'estremità 5' (Muriaux *et al.*, 2001). Entrambi i filamenti portano alle rispettive estremità una sequenza unica (U5 in 5' e U3 in 3') fiancheggiata esternamente da una sequenza ripetuta R. E' da queste regioni del genoma che si formano, durante il processo di retrotrascrizione, le due *Long Terminal Repeats* (LTR) organizzate nella struttura U3-R-U5, presenti alle estremità del genoma provirale (figura 3.3.). Nonostante le due molecole di RNA possiedano un cap metilato in 5' ed una coda di poliA in 3', l'espressione dei geni virali avviene a partire dal riconoscimento di promotori virus-specifici, ad opera della RNA polimerasi II cellulare, che si originano a livello della 5' LTR solo dopo che i processi di retrotrascrizione ed integrazione sono avvenuti.

3.1.2. Organizzazione del genoma e meccanismi di regolazione dell'espressione genica

Il genoma di HIV-1 codifica le principali proteine enzimatiche e strutturali che accomunano tutti i Retrovirus. A partire dall'estremità 5' alla 3' dell'RNA sono presenti i geni *gag* (*Group-specific AntiGene*), *pol* (*POLymerase*) ed *env* (*ENVelope glycoproteins*). Il gene *gag* codifica le proteine con funzione strutturale che compongono il nucleocapside e che intervengono nel riconoscimento e nell'incorporazione dell'RNA genomico e nell'ancoraggio alla membrana plasmatica delle particelle in via di formazione. Il gene *pol* codifica gli enzimi virali PR, RT ed IN, mentre l'espressione del gene *env* porta alla sintesi delle glicoproteine di superficie (Varmus *and* Brown, 1989). Nella forma integrata, i tre geni mantengono l'orientamento 5'-*gag-pol-env*-3' e sono fiancheggiati dalle due LTR (figura 3.3.). Queste ultime contengono sequenze *cis*-agenti necessarie per la regolazione trascrizionale dell'espressione dei geni virali, la replicazione, l'integrazione ed il riconoscimento dell'RNA come genoma virale (Freed, 2001). Oltre ai geni *gag*, *pol* ed *env*, il genoma di HIV-1 codifica una serie di proteine che agiscono *in trans* e che hanno funzione accessoria e regolatoria per la replicazione del virus. Tra i geni regolatori, sono essenziali per la replicazione di HIV-1 *tat* (*Trans Activator of Transcription*) e *rev* (*Regulator of Virion Protein expression*), espressi nelle prime fasi dell'infezione virale (Freed, 2001). La trascrizione dei geni virali inizia a livello della 5' LTR, nella regione compresa tra la sequenza R e U5 del provirus integrato, ed è mediata dalla RNA polimerasi II cellulare (Varmus *and* Brown, 1989). Come tutti gli RNA messaggeri cellulari, ai trascritti virali vengono aggiunti un cap metilato in 5' ed una coda di poliadenine (poli A) in 3' (Cherrington *and* Ganem, 1992). La trascrizione del genoma virale procede a più fasi. Il primo evento trascrizionale porta la formazione di corti trascritti incompleti, corrispondenti alla regione TAR (*Trans-Activation Response sequence*), localizzata in una regione della 5' LTR (Cullen, 1993), e di una piccola frazione di trascritti che corrisponde al genoma virale completo (9 kb). Subito dopo la sua sintesi, l'mRNA di 9 kb viene rapidamente modificato dal macchinario di *splicing* cellulare, dando origine a corti mRNA codificanti le proteine regolatorie Tat, Rev e Nef (Pavlakakis *et al.*, 1992). Tat e Rev svolgono due

funzioni essenziali per la replicazione del virus. La proteina Tat, di 101 amminoacidi, riconosce e lega la sequenza TAR presente nella 5' LTR, promuovendo l'attività trascrizionale dell'RNA polimerasi II cellulare sui geni virali. La capacità di Tat di incrementare l'efficienza dei processi di iniziazione e di elongazione della trascrizione, agendo positivamente sulla processività dell'RNA polimerasi II, porta alla sintesi dei trascritti virali più lunghi (figura 3.3.) (Zhou *and* Sharp, 1995). Il passaggio dalla fase precoce a quella tardiva è determinato dall'azione concordata di Tat e Rev. Se Tat agisce a livello trascrizionale permettendo la sintesi dei lunghi trascritti virali, Rev ne modula i processi di *splicing* ed il trasporto dal nucleo al citoplasma (Pollard *and* Malim, 1998).

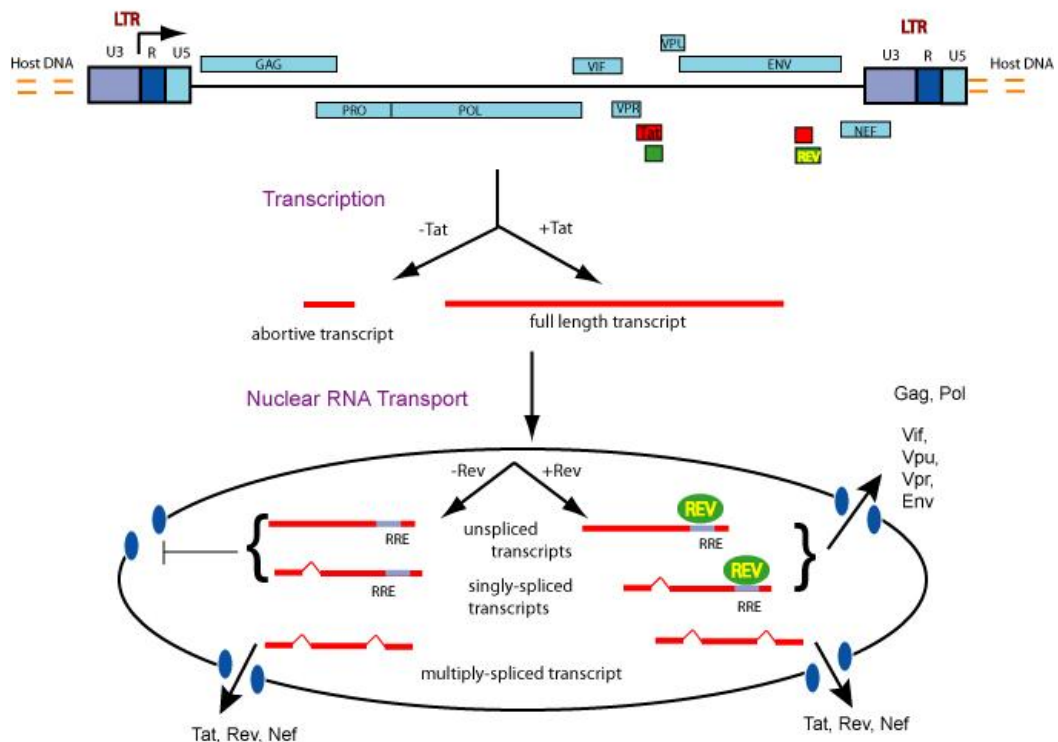


Figura 3.3. Rappresentazione schematica dell'organizzazione del genoma di HIV-1. Il meccanismo con cui avvengono la regolazione della trascrizione da parte della proteina accessoria Tat ed il trasporto dal nucleo al citoplasma dei lunghi trascritti virali permesso da Rev sono indicati.

La proteina Rev, di 19 kDa, riconosce con elevata affinità la sequenza RRE (*Rev Responsive Element*), localizzata a livello del gene *env*, e promuove il trasporto dal nucleo al citoplasma dei lunghi trascritti virali, quali l'RNA genomico neosintetizzato ed i trascritti virali prodotti dalla trascrizione del gene *env*, che altrimenti verrebbero sottoposti a molteplici eventi di *splicing* (figura 3.3.). In questo modo Rev favorisce l'espressione dei geni strutturali, a scapito di quelli regolatori (Cullen, 1998; Pongoski *et al.*, 2002). Rev viene espressa a partire da mRNA bicistronici, che codificano anche la proteina Nef. Nef è una fosfoproteina di 27 kDa che si localizza nella membrana plasmatica grazie alla presenza di un acido miristico presente all'estremità N-terminale. La sua funzione meglio caratterizzata è promuovere l'endocitosi clatrina-mediata del recettore CD4 e favorirne la degradazione (Aiken *et al.*, 1994), riducendo quindi la probabilità di formare complessi gp120-CD4 intracellulari ed aumentando la quantità di glicoproteina virale veicolata in superficie. Inoltre, Nef induce la degradazione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe prima (MHCI), limitando il riconoscimento delle cellule infette da parte dei linfociti T citotossici (Collins *et al.*, 1998). Il passaggio alla fase successiva vede la traduzione dei trascritti che portano le informazioni necessarie alla sintesi delle proteine strutturali del virus. In particolare, l'espressione del gene *gag* porta alla sintesi di un unico precursore poliproteico di 55 kDa, il Pr55Gag (Swanstrom *et al.*, 1997; Freed, 1998). Durante la sua traduzione questo precursore viene modificato all'estremità N-terminale mediante l'aggiunta di una molecola di acido miristico. Questa modificazione è essenziale per l'ancoraggio del Pr55Gag alla membrana cellulare che dà avvio all'assemblaggio del virione. Oltre al segnale di miristilazione, la poliproteina contiene numerosi motivi funzionali, che svolgono ruoli cruciali nell'assemblaggio e nella formazione delle particelle virali. Ad esempio, sono presenti segnali di localizzazione alla membrana plasmatica, che indirizzano i precursori ai siti di assemblaggio; domini di interazione intermolecolari che permettono l'oligomerizzazione dei precursori Pr55Gag ed il riconoscimento delle glicoproteine virali di superficie; siti di interazione con gli acidi nucleici che riconoscono l'RNA genomico virale e ne consentono l'incorporazione e segnali che guidano la gemmazione della particella virale dalla cellula ospite. La sintesi degli enzimi virali codificati dal gene *pol* avviene

attraverso un intermedio poliproteico, generato dalla fusione dei prodotti dei geni *gag* e *pol*. Il precursore poliproteico Pr160GagPol, si origina infatti a causa di un evento di scorrimento della fase di lettura dei ribosomi (*frameshift*) che interessa la regione intermedia tra i trascritti dei due geni coinvolti (Jacks *et al.*, 1988). Questo evento è piuttosto raro, per cui il rapporto tra le proteine strutturali e gli enzimi virali è di circa 20:1 (Hunter, 1994). Anche questa poliproteina va incontro a maturazione completa solo dopo l'assemblaggio ed il rilascio della particella neoformata, grazie all'attività catalitica della proteasi virale, portando alla completa funzionalità gli enzimi PR, RT ed IN (Figura 3.4.). Il gene *env* codifica un unico precursore proteico di 160 kDa (gp160) che, a livello del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi, viene altamente glicosilato e processato da una proteasi cellulare (furina) per dare origine alle due glicoproteine dell'*envelope* gp120 e gp41 (Freed and Martin, 1995). Attraverso la via secretoria, le due molecole di superficie vengono trasportate alla membrana cellulare, dove interagiscono tra loro mediante legami non covalenti e si organizza in forma trimerica.

I geni di HIV-1 considerati non essenziali per la replicazione, vengono detti accessori e codificano tre proteine Vpr, Vpu e Vif, che assieme a Nef, contribuiscono *in vivo* all'infettività del virus e alla progressione della malattia.

Vpr (*Viral Protein R*) è una piccola proteina di 14 kDa, che viene prodotta da un corto mRNA sottoposto ad un unico evento di *splicing*. Grazie all'interazione con una specifica regione dell'estremità carbossi-terminale di Pr55Gag, viene incorporata nella particella virale. All'interno del citoplasma della cellula infettata, Vpr partecipa ai meccanismi di migrazione verso il nucleo dei complessi nucleoproteici contenenti il DNA virale (PIC) (Agostini *et al.*, 2002; Sherman and Greene, 2002). Attraverso l'attivazione di specifici promotori virali e cellulari (Cohen *et al.*, 1990), Vpr è in grado di portare all'arresto delle cellule infettate in fase G₂ (He *et al.*, 1995; Chowdhury *et al.*, 2003), stadio del ciclo cellulare in cui l'attività trascrizionale promossa dall'LTR virale viene favorita.

Vpu (*Viral Protein U*) è una proteina di 81 amminoacidi, espressa a partire dallo stesso mRNA che dà origine alle glicoproteine dell'*envelope*. Vpu facilita il rilascio delle particelle virali dalla superficie cellulare (Deora and Ratner, 2001) e,

come Nef, promuove la degradazione del recettore CD4 tramite la via “ubiquitina-proteasoma” (Margottin *et al.*, 1998).

La proteina Vif (*Viral Infectivity Factor*) è altamente conservata fra i Lentivirus e si forma dalla traduzione di un trascritto sottoposto ad un unico evento di *splicing* (Garrett *et al.*, 1991). Anche Vif viene incorporata nella particella neoformata tramite l’interazione diretta con l’estremità 5’ dell’RNA genomico virale (Khan *et al.*, 2001; Henriet *et al.*, 2005). La sua capacità di contrastare l’effetto inibitorio delle citidina-deaminasi delle famiglia APOBEC sul processo di retrotrascrizione è essenziale per la replicazione del virus in cellule considerate non permissive. Per questo motivo viene identificata come il fattore di infettività del virus.

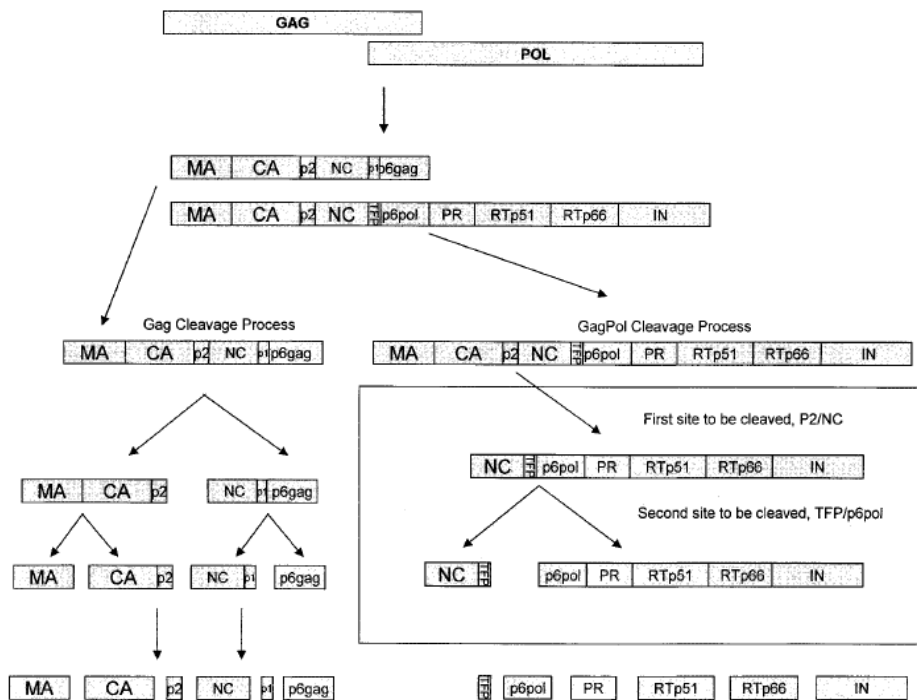


Figura 3.4. Schema rappresentativo dell’ordine e dei prodotti che si originano dall’attività proteolitica della proteasi virale sui substrati poliproteici specifici Pr55Gag e Pr160GagPol di HIV-1 (immagine modificata da Oliveira *et al.*, 2003).

3.1.3. Il ciclo replicativo di HIV-1

Il ciclo replicativo di HIV-1 è un processo complesso che procede a più fasi a cui partecipano fattori sia virali che cellulari. In termini generali, presenta caratteristiche molto simili a quelle di tutti gli altri Retrovirus. Ci sono però molti aspetti unici che caratterizzano la replicazione di HIV-1. In particolare, l'infezione ha inizio con l'ingresso del virus nella cellula bersaglio, che consiste nella fusione dell'*envelope* virale con la membrana plasmatica cellulare (Doms, 2004). La componente virale che dà il via al processo di fusione è il complesso trimerico delle glicoproteine virali, gp120 e gp41 (Roux *and* Taylor, 2007). In particolare, il processo viene avviato dallo specifico riconoscimento da parte di regioni conservate della gp120 del recettore cellulare CD4. La specificità di questa reazione è essenziale per la definizione del tropismo virale che è circoscritto a linfociti T e cellule della linea monocito-macrofagica. Questa interazione ad alta affinità è responsabile, *in vitro*, della formazione di sincizi fra cellule esprimenti il recettore CD4 e cellule infettate dal virus che presentano molecole di gp120 sulla loro superficie. Il legame al CD4 è necessario ma non sufficiente per indurre la fusione delle membrane e l'ingresso del virus nella cellula. Il cambiamento conformazionale indotto dal legame della gp120 al recettore CD4 porta all'esposizione di un'ansa interna variabile, in grado di riconoscere sulla membrana plasmatica membri della superfamiglia di proteine a sette domini transmembrana associate a proteine G, i recettori per le chemochine α e β , che fisiologicamente trasmettono segnali intracellulari in risposta a chemochine. Molti dei membri di questa famiglia possono essere riconosciuti dalla gp120, ma *in vivo* la capacità del virus di entrare nella cellula bersaglio è più spesso correlata alla presenza sulla membrana cellulare dei recettori CXCR4 (recettore per le α chemochine) e CCR5 (recettore per le β chemochine) (Alkhatib *et al.*, 1996; Oberlin *et al.*, 1996). Il fatto che queste due molecole siano differenzialmente espresse in specifiche condizioni su tipi cellulari diversi, rispettivamente CXCR4 sui linfociti T e CCR5 sui macrofagi, determina la possibilità di isolare ceppi virali con diverso tropismo. In termini generali, gli isolati virali in grado di infettare selettivamente cellule della linea monocito-macrofagica vengono definiti "isolati primari macrofago-tropici", "M-tropici" o "R5-tropici"; virus in grado di

infettare efficientemente i linee cellulari e cellule primarie T CD4-positivo con bassa infettività nei confronti di cellule della linea monocito-macrofagica sono detti “isolati primari T-tropici” o “X4-tropici”; inoltre sono stati identificati ceppi in grado di entrare nelle cellule bersaglio utilizzando sia il corecettore CXCR4 sia il CCR5, questi ceppi a doppio tropismo vengono definiti “isolati dual-tropici” o “X4R5-tropici” (Berger *et al.*, 1999). Dopo alcuni passaggi in cultura, isolati primari T-tropici hanno la tendenza a perdere la capacità di infettare cellule della linea monocito-macrofagica, restringendo così la capacità di infezione alle sole cellule T; l’isolato virale viene allora definito ceppo adattato in laboratorio a replicarsi in cellule T (*T-Cell Laboratory Adapted*, TCLA). La caratterizzazione di questi fenomeni ha portato all’identificazione dei corecettori, che *in vivo* svolgono un ruolo particolarmente importante nel determinare l’infettività del virus o la resistenza all’infezione. Il corecettore CCR5 è il principale utilizzato durante lo stadio primario asintomatico dell’infezione ed i virus R5 sono i maggiori responsabili della trasmissione da individuo ad individuo (Gorry *and* Ancuta, 2011).

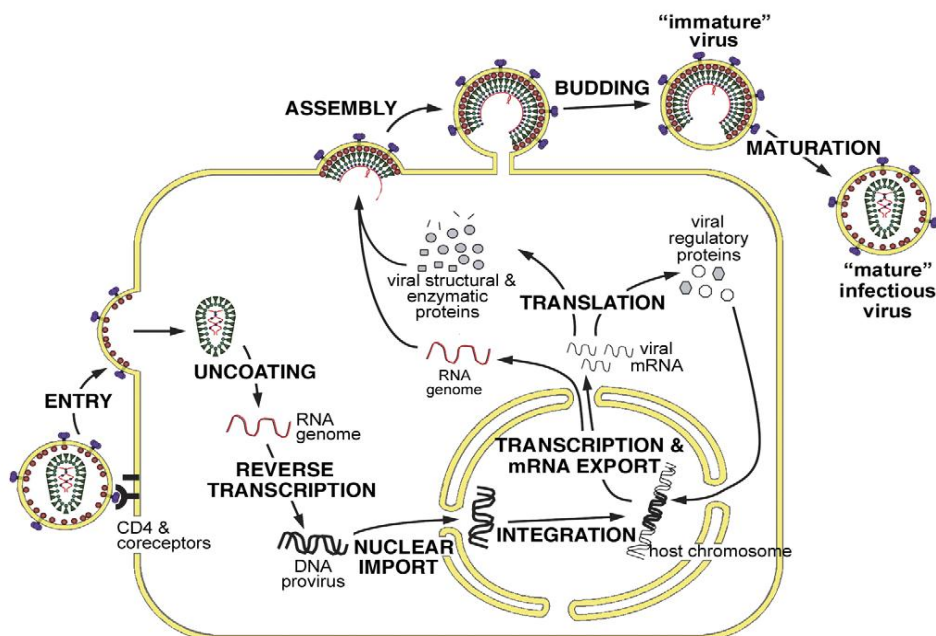


Figura 3.5. Immagine rappresentativa delle diverse fasi che caratterizzano il ciclo replicativo di HIV-1 (da Ganser-Pornillos *et al.*, 2008).

Durante le fasi tardive dell'infezione possono emergere isolati virali che utilizzano CXCR4 come corecettore per l'infezione. La comparsa di ceppi X4- o dual-tropici è spesso associata *in vivo* ad un rapido declino del numero di linfociti CD4-positivi e della comparsa della malattia conclamata.

Il riconoscimento della cellula bersaglio dato dal legame della gp120 a recettore e corecettore cellulari induce un notevole riarrangiamento conformazionale nella glicoproteina virale che si traduce nell'esposizione del peptide di fusione della gp41. L'inserimento di questo peptide nella membrana plasmatica innesca la fusione tra il virus e la cellula bersaglio. Il core virale viene quindi rilasciato nel citoplasma dove la maggior parte delle proteine di matrice viene persa ed il core virale va incontro al processo di scapsidazione, in cui capsidone viene perso (Arhel, 2010). La retrotrascrizione dell'RNA genomico virale a DNA bicatenario, catalizzato dalla RT, ha inizio già all'interno del core, ma richiede il disassemblaggio e la scapsidazione per l'avanzamento del processo (Auewarakul *et al.*, 2005). Gli acidi nucleici e le proteine virali che portano un segnale di localizzazione nucleare (MA, Vpr, IN) rimangono associati in un complesso nucleoproteico, detto *Reverse Transcription Complex* (RTC), che migra verso il compartimento nucleare (Briggs *et al.*, 2006). La migrazione di RTC verso il nucleo viene promossa dall'interazione con i microfilamenti di actina che compongono il citoscheletro della cellula ospite (Bukrinskaya, 2004). Una volta raggiunto il nucleo, con la conclusione del processo di retrotrascrizione si osserva una riduzione delle dimensioni del complesso ora formato dal DNA provirale, NC, RT, IN, MA e Vpr, detto complesso di pre-integrazione (PIC, *Pre-Integration Complex*). Mediante un meccanismo di trasporto attivo, il PIC entra nel nucleo ed il DNA provirale viene integrato nel genoma della cellula ospite, ad opera dell'integrasi virale (Brown, 1997).

A questo punto inizia la trascrizione attiva dei geni virali e la sintesi di nuove molecole di RNA genomico. Le proteine Tat e Rev, espresse nelle fasi precoci dell'infezione, danno il via all'espressione dei geni strutturali: le proteine dell'*envelope*, appropriatamente glicosilate e processate a livello del Golgi, vanno a localizzarsi sulla superficie della cellula in specifici domini lipidici; i precursori poliproteici Pr55Gag e Pr160GagPol vengono indirizzati alla membrana plasmatica dove si associano, dando inizio all'assemblaggio di nuove particelle

virali (Checkley *et al.*, 2011; Ganser-Pornillos *et al.*, 2008). Viene così a formarsi una struttura ricurva, che sporge dalla membrana nel punto in cui sono concentrate le glicoproteine dell'*envelope*. Le particelle virali immature neoformate vengono rilasciate dalla membrana plasmatica per gemmazione (Hunter, 1994; Lee *and* Linial, 1994). La digestione proteolitica del precursore capsidico e di quello degli enzimi replicativi, ad opera della proteasi virale, rappresenta lo stadio finale della formazione dei virioni maturi ed avviene solo in seguito al rilascio della particella dalla cellula. Questa modificazione porta ad un riorientamento della struttura interna del virione: la proteina matura MA rimane a contatto con la superficie interna dell'*envelope*, i monomeri CA si assemblano nella caratteristica struttura a forma di cono e le molecole di NC rimangono associate a protezione del genoma virale. La corretta regolazione temporale del processo di maturazione è essenziale per garantire l'infettività della particella. Se questa proteolisi si verifica prima della gemmazione la struttura capsidica collassa ed il distacco dalla cellula non può avvenire.

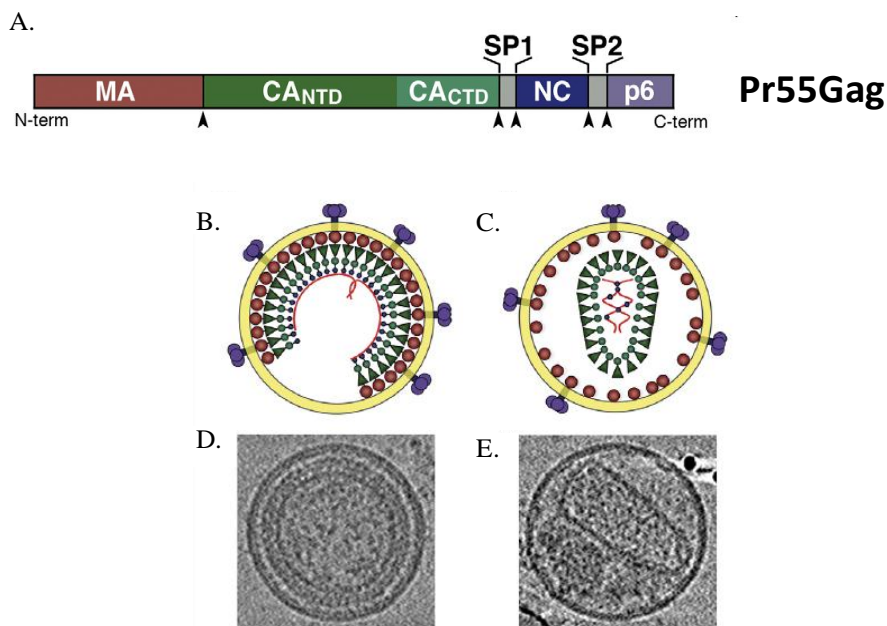


Figura 3.6. Rappresentazione schematica del processo che porta alla maturazione della particella virale di HIV-1, una volta gemmata dalla superficie della cellula infetta. **A.** Precursore strutturale Pr55Gag: sono indicati i diversi domini: MA, CA, NC, p6 ed i due peptidi SP1 (p2) e SP2 (p1); ed i siti di taglio riconosciuti dalla proteasi virale. Schema **(B.)** ed ultrastruttura **(D.)** della particella virale immatura. Schema **(C.)** ed ultrastruttura **(E.)** del virione maturo (da Ganser-Pornillos *et al.*, 2008).

3.2. La patogenesi dell'infezione da HIV-1 e la terapia farmacologica

3.2.1. Caratteristiche cliniche dell'infezione

Il decorso dell'infezione da HIV è caratterizzato da diverse fasi cliniche (figura 3.7.), la cui evoluzione è molto variabile e può essere influenzata da fattori sia virali che individuali, primo fra tutti l'impiego di una adeguata terapia antiretrovirale. Nella maggior parte dei casi, pazienti che non dispongono di presidi terapeutici presentano un quadro patologico drammatico che conduce alla morte del soggetto in 7-10 anni. La prima fase, successiva al contagio, è detta di Infezione Acuta Primaria e va dal momento del contagio alla conclusione dei sintomi clinici, se presenti, o alla comparsa di anticorpi specifici per il virus (sieroconversione). L'infezione ha un lungo periodo di incubazione e può essere asintomatica o caratterizzata da una sintomatologia indifferenziata, simile ad altre infezioni virali come quella dell'influenza e della mononucleosi, con febbre, mal di gola, stanchezza, ingrossamento delle ghiandole linfatiche, eruzioni cutanee. Durante l'infezione acuta il tasso di replicazione virale che si osserva è molto elevato (quasi sempre superiore alle 10^6 copie di HIV-RNA/ml) ed è responsabile della diffusione del virus agli organi linfoidi (Daar *et al.*, 1991; Tindall and Cooper, 1991). Al rapido aumento della viremia si associa la significativa deplezione dei linfociti T CD4-positivi nel sangue periferico (Gaines *et al.*, 1990). Il periodo che intercorre tra il contagio e la sieroconversione è detto "periodo finestra" e può avere una durata variabile dai 2 ai 6 mesi. La comparsa di una risposta anticorpale specifica porta alla diminuzione della viremia ed al raggiungimento di uno stato di equilibrio detto "set point virale". Questa fase di latenza clinica è caratterizzata da una lenta replicazione del virus a livello delle cellule immunitarie circolanti (linfociti T e macrofagi), ma che persiste a livello dei tessuti linfoidi causando la lenta e progressiva perdita di linfociti T CD4-positivi. La fase di Linfadenopatia Generalizzata Persistente spesso non è clinicamente distinta dalla precedente, ma è caratterizzata da un'alterazione della struttura istologica dei linfonodi, che risultano ingrossati. Il progredire della malattia è dovuto al progressivo danneggiamento del sistema immunitario, che si evidenzia per la marcata riduzione dei linfociti T CD4-positivi (da normali valori

di 1000 cellule/mm³ si passa a 200 cellule/mm³) e dalla comparsa di infezioni opportunistiche, neoplasie e disturbi a carico del SNC. A questo punto si entra nella fase di malattia conclamata, la Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS, *Aquired ImmunoDeficiency Syndrome*).

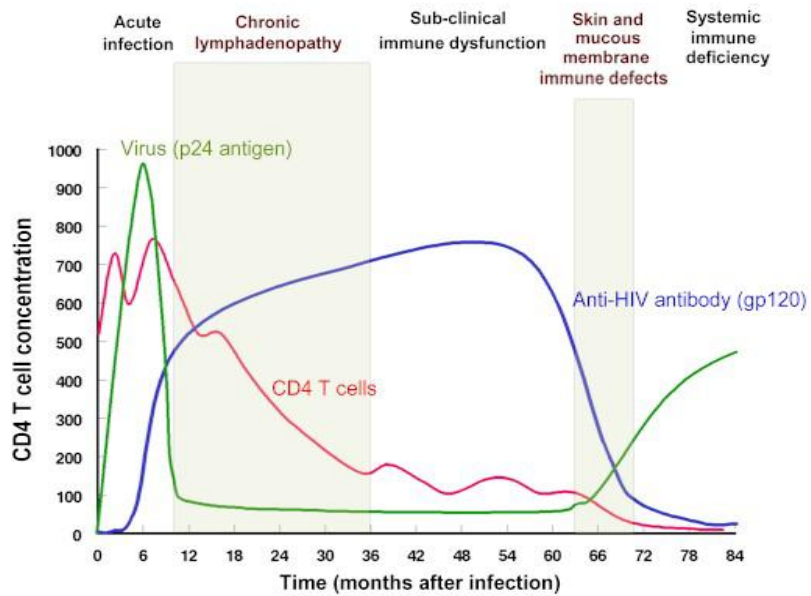


Figura 3.7. Schema dell'andamento dei principali parametri che regolano lo stato dell'infezione da HIV-1 durante le diverse fasi cliniche.

3.2.2. Strategie per il controllo dell'infezione

HIV-1 è stato identificato come agente eziologico dell'AIDS nel 1983 (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984; Blattner *et al.*, 1988) e ad oggi rimane uno dei patogeni a cui sono volti i maggiori sforzi di gestione nei sistemi di Sanità Pubblica mondiale.

Molte speranze sono state riposte sullo sviluppo di strategie vaccinali che potessero essere protettive nei confronti dell'infezione da HIV-1. Sono stati disegnati e sperimentati vaccini basati su virus inattivati, su subunità proteiche ricombinanti del virus (gp160, MA o CA), e vaccini a DNA costituiti da vettori (plasmidici o virali) contenenti specifiche sequenze il cui prodotto, *in vivo*, si è dimostrato in grado di scatenare una risposta anticorpale e cellulare (Montagnier, 2010). Ad oggi nessuno di questi sistemi è entrato nella pratica clinica. Recentemente sono oggetto di studio approcci terapeutici basati su sistemi di terapia genica, che consistono nell'inserimento di sequenze esogene in cellule di pazienti infetti che, se re-infuse nell'organismo, sono in grado di impedire la replicazione *de novo* del virus, agendo su bersagli virali o cellulari, di intaccare i serbatoi del virus o stimolare un'adeguata risposta antivirale.

Ad oggi, la chemioterapia costituisce l'unico sistema in grado di controllare l'infezione da HIV-1 e ridurre la progressione della malattia. Il primo farmaco antiretrovirale approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) è stato la zidovudina (AZV) nel 1987. Negli anni successivi sono stati validati ed introdotti in commercio altre molecole antiretrovirali capaci di bloccare specifiche fasi del ciclo replicativo di HIV-1. Oggi esistono più di venti farmaci utilizzati nel trattamento dell'infezione da HIV-1 (Cane, 2009). In particolare, le classi disponibili includono:

- inibitori della trascrittasi inversa (*Reverse Transcriptase Inhibitors*, RTIs), che sono stati i primi farmaci ad essere utilizzati nella terapia anti-HIV-1. Si distinguono inibitori nucleosidici (*Nucleoside RTIs*, NRTIs) e non-nucleosidici (*Non-Nucleoside RTIs*, NNRTI), entrambi in grado di bloccare l'attività polimerasica dell'enzima, ma con meccanismi molecolari diversi. Gli NRTIs funzionano da inibitori competitivi (o substrati alternativi) della RT. Sono analoghi dei nucleosidi che, una volta all'interno della cellula,

vengono fosforilati ed agiscono come terminatori di catena nel processo di retrotrascrizione. Di questa categoria fanno parte zidovudina (AZT), dianosina (ddI), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), emtricitabina (FTC), stavudina (d4T), abacavir (ABC), tenofovir (TDF). Gli NNRTIs invece inibiscono l'attività polimerasica di RT legandosi ad un sito allosterico idrofobico adiacente al core catalitico dell'enzima e sono delavirdina (DLV), efavirenz (EFV), nevirapina (NVP), etravirina (TMC 125);

- inibitori della proteasi (*Protease Inhibitors*, PIs), molecole fondamentali nei regimi HAART, che impediscono il processamento dei precursori poliproteici negli stadi tardivi del ciclo replicativo virale, portando alla produzione di particelle non infettive. Fatta eccezione per il tipranavir (TPV), i PIs sono composti basati sul substrato che agiscono come inibitori competitivi dell'azione proteolitica necessaria per la maturazione (Louis *et al.*, 2007; Menéndez-Arias and Tözser, 2008). Appartengono a questa classe ritonavir (RTV), atazanavir (ATV), Lopinavir (LPV/r, utilizzato solo nella formulazione *boosterata* con RTV), indinavir (IDV), saquinavir (SQV), darunavir (TMC 114), amprenavir (APV), fosamprenavir (FPV, pro-farmaco di APV) e nelfinavir (NFV);
- inibitori della maturazione, rappresentati da bevirimat (BVM), agiscono sul processo di maturazione, ma non sono PIs. Il BVM è un derivato dell'acido betulico che, legandosi al substrato Pr55Gag, ne impedisce il processamento e porta ad un'alterazione della morfologia strutturale delle particelle prodotte, che risultano così non infettive (Zhou *et al.*, 2004);
- inibitori dell'integrasi (*Integrase Inhibitors*, IIs), utilizzati solo in pazienti che hanno fallito i trattamenti con le altre classi di farmaci, che interferiscono con l'integrazione del genoma virale in quello della cellula ospite. L'unico farmaco ad oggi approvato è il raltegravir (RAL), un dichetoacido in grado di bloccare la reazione di *strand-transfer* che avviene tra il DNA provirale chimicamente attivato e la doppia elica di DNA genomico cellulare (Semenova *et al.*, 2008; Hazuda *et al.*, 2009; Serrao *et al.*, 2009);
- inibitori dell'ingresso del virus, che includono antagonisti dei corecettori ed inibitori di fusione. Il maraviroc è un antagonista selettivo del CCR5 ed

è in grado di legare un sito esposto durante l'interazione tra il recettore e la gp120. Questo farmaco ha dimostrato potente attività antivirale nei confronti di tutti gli isolati HIV-1 macrofago-tropici testati (Dorr *et al.*, 2005; Gulick *et al.*, 2008). L'unico inibitore di fusione approvato per l'uso clinico è l'enfuvirtide (T20), un peptide sintetico che blocca il cambiamento conformazionale della gp41 responsabile dell'esposizione del peptide di fusione (Matthews *et al.*, 2004).

Nel 1995 con l'introduzione della HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), che consiste nell'associazione di un minimo di tre farmaci antiretrovirali appartenenti ad almeno due classi distinte, la sopravvivenza e la qualità della vita dei pazienti con AIDS è sensibilmente migliorata. Studi di coorte e sistemi di sorveglianza hanno mostrato una chiara diminuzione dell'incidenza di quasi tutte le infezioni opportunistiche associate alla progressione della malattia nei pazienti HIV-1 positivi sottoposti alla terapia (Bhaskaran *et al.*, 2008). Le attuali Linee Guida raccomandano l'utilizzo di due NRTIs in associazione ad un PI o un NNRTI come terapia di prima linea. La semplificazione del trattamento, il numero di somministrazioni, la tollerabilità individuale ai farmaci, le interazioni tra farmaci e la presenza di resistenze nel paziente possono influenzare notevolmente la scelta del regime terapeutico da applicare. L'obiettivo principale è la soppressione della replicazione del virus con conseguente miglioramento dello stile di vita del paziente e con il minor ricorso all'ospedalizzazione. Tuttavia, nessuna formulazione farmacologica è in grado di assicurare il persistere dell'inibizione della replicazione virale; infatti, in oltre il 50% dei pazienti si ha il fallimento terapeutico dopo solo alcuni mesi dall'inizio del trattamento, con conseguente aumento della carica virale in circolo (viremia). Differenti aspetti possono contribuire a questo fenomeno: caratteristiche virali, come la carica iniziale o la trasmissione di particolari varianti, e caratteristiche individuali, come lo stato di salute, l'aderenza al trattamento e la tossicità indotta dal presidio terapeutico, sono condizioni che predispongono al mancato funzionamento dei farmaci. Esistono inoltre compartimenti anatomici e cellulari, come il Sistema Nervoso Centrale (SNC), i testicoli, alcuni distretti linfonodali, cellule T della memoria, macrofagi e cellule gliali, in cui il virus persiste in forma latente, al riparo dall'azione dei farmaci (Chun *et al.*, 1997; Finzi *et al.*, 1999). La causa

principale del fallimento terapeutico è senza dubbio da attribuire alle caratteristiche biologiche del virus: l'elevato tasso di mutazione, dovuto alla scarsa fedeltà della RT, in associazione all'elevata frequenza di ricombinazione e all'alto tasso di replicazione durante le prime fasi dell'infezione portano alla continua produzione di quasispecie virali, tra le quali vengono selezionate positivamente quelle in grado di replicarsi nonostante la terapia antiretrovirale in atto.

3.2.3. I meccanismi molecolari della farmacoresistenza

Varianti virali resistenti a tutti i farmaci antiretrovirali oggi disponibili sono state identificate sia *in vitro* che *in vivo* (Johnson *et al.*, 2010). In generale, i ceppi resistenti presentano mutazioni a carico dei geni codificanti i bersagli farmacologici della terapia, che sono in grado di diminuire o annullare l'effetto degli inibitori (Menéndez-Arias, 2010). Nonostante l'impatto negativo che queste mutazioni possono avere sulle funzionalità strutturali od enzimatiche del virus, i ceppi che emergono hanno una capacità replicativa più alta in condizioni di regime terapeutico rispetto ad un virus *wild type*. Tuttavia, in molti casi ciò che si osserva è un'iniziale riduzione della competenza replicativa del virus mutante. La continua persistenza della pressione selettiva esercitata dai farmaci seleziona successivamente ceppi in grado di instaurare meccanismi compensatori, che riportano la capacità replicativa del virus alle condizioni ottimali (Nijhuis *et al.*, 2007; Aoki *et al.*, 2009). Molti di questi meccanismi sono ormai noti ed utilizzati nella pratica clinica per disegnare strategie farmacologiche *ad hoc* per ciascun paziente, ma i meccanismi molecolari che sottendono a tali processi sono complessi e multifattoriali. Per quanto riguarda le due classi di antiretrovirali più usate e considerate lo *standard of care* per il trattamento dell'infezione da HIV-1, RTIs e PIs, le informazioni sui principali meccanismi di resistenza sono state ricavate da studi che spaziano dall'epidemiologia, alla biochimica, fino ad arrivare alla determinazione della struttura tridimensionale.

Mutazioni di resistenza a RTIs

La resistenza agli inibitori della trascrittasi inversa insorge principalmente attraverso l'accumulo di una o più mutazioni a carico della sequenza codificante l'enzima. Le mutazioni identificate in ceppi resistenti agli inibitori nucleosidici (NRTIs) includono singole sostituzioni nucleotidiche, che si traducono in cambiamenti amminoacidici in grado di ridurre la capacità dell'enzima di legare l'analogo nucleotidico. Sono state osservate anche inserzioni o delezioni in grado di provocare la rimozione selettiva (excisione) dell'inibitore dalla fine della catena nascente del DNA virale. Per conferire resistenza agli inibitori allosterici (NNRTIs) è sufficiente che compaiano singole sostituzioni amminoacidiche attorno al sito di legame dell'inibitore. La facilità con cui emergono ceppi resistenti a questi farmaci richiede che siano utilizzati necessariamente in formulazioni combinate. Nella pratica clinica, le informazioni che si ricavano dall'analisi della sequenza codificante il core catalitico dell'enzima (amminoacidi 1-324) vengono considerate sufficienti per identificare profili di resistenze in pazienti sottoposti ad HAART.

Mutazioni di resistenza a PIs

Sono numerose le mutazioni che conferiscono resistenza agli inibitori della proteasi ed avvengono prevalentemente a carico del sito attivo dell'enzima. Nello specifico, la regione più coinvolta è la tasca idrofobica in cui avviene la reazione proteolitica, sito di legame per gli inibitori (figura 3.8.). Possono anche comparire sostituzioni in grado di alterare la stabilità dell'enzima, riducendo l'affinità di legame per l'inibitore ma anche per il suo substrato. Queste mutazioni sono dette primarie ed hanno forti ripercussioni sull'attività enzimatica della proteasi virale. Studi di funzionalità *in vitro* su peptidi che presentano i normali siti di taglio riconosciuti dalla proteasi hanno dimostrato che queste mutazioni portano ad una ridotta efficienza proteolitica dell'enzima mutato (Colunno *et al.*, 2004; Nijhuis *et al.*, 2007). Questi difetti sono ancora più evidenti in virus che codificano proteasi resistenti ai PIs: la scarsa efficienza con cui vengono riconosciuti e processati i precursori Pr55Gag e Pr160GagPol porta ad una drastica riduzione dell'infettività

dei virioni formati. *In vivo* le ricadute funzionali delle mutazioni primarie sulla capacità replicativa del virus spesso inducono la selezione di varianti virali in cui compaiono sostituzioni amminoacidiche aggiuntive nella proteasi in grado di compensare ai difetti catalitici della proteasi e di aumentare così la *fitness* del virus. Queste mutazioni sono definite secondarie o compensatorie.

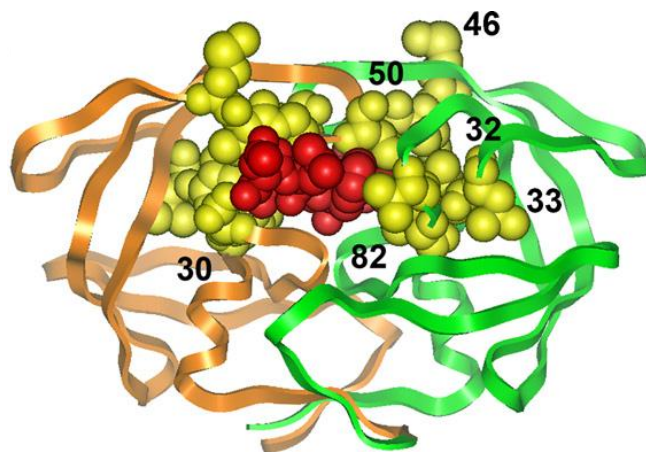


Figura 3.8. Struttura cristallografica della proteasi di HIV-1 complessata con un inibitore. Le due catene polipeptidiche che compongono l'enzima sono rappresentate in arancione e verde, l'inibitore in rosso. In giallo sono rappresentati i residui coinvolti nell'acquisizione di mutazioni di resistenza primarie (da Menendez-Arias, 2010).

Queste informazioni sono attualmente ben supportate da dati di laboratorio e studi epidemiologici e vengono utilizzate nella pratica clinica per predire l'efficacia dei trattamenti farmacologici in pazienti naïve o per identificare i profili di mutazione responsabili del fallimento terapeutico in pazienti trattati (Johnson *et al.*, 2010). Vista la continua necessità di monitorare lo stato dell'infezione per garantire un'adeguata assistenza medica ai pazienti HIV-1 positivi, nel tempo sono stati sviluppati diversi sistemi per individuare le farmacoresistenze. I test di fenotipizzazione prevedono la ricostruzione *in vitro* di un virus chimerico contenente la regione del gene *pol* derivata dal paziente e permettono di valutarne l'effetto sulla capacità replicativa del virus in presenza degli inibitori. Questi sistemi forniscono una misura diretta della resistenza indotta da PR e RT mutanti nei confronti di uno specifico farmaco. Nonostante la solidità dei risultati forniti

da questo tipo di saggi, ad oggi nella pratica clinica vengono più comunemente utilizzati i test di genotipizzazione. Il test prevede l'analisi della sequenza genotipica del virus, in particolare della regione codificante PR e la porzione catalitica di RT, utilizzando l'RNA o il DNA virale isolato da plasma o da PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) del paziente. L'utilizzo dei sequenziatori automatici e di software periodicamente aggiornati ha notevolmente ridotto i tempi ed i costi dell'indagine. Nonostante l'indiscutibile utilità di questi sistemi nella gestione quotidiana delle pratiche cliniche, è sempre più chiaro che da un punto di vista biologico i profili genetici di PR e/o RT non sempre sono sufficienti per spiegare l'esito dell'infezione *in vivo*. Infatti sono numerosi i dati oggi disponibili a supporto dell'idea che altri fattori virali sino implicati nello sviluppo delle resistenze.

3.2.4. Il ruolo di Gag nei processi di resistenza

I risultati più consistenti riguardano il contributo del gene *gag*, che da un punto di vista biologico è strettamente correlato al gene *pol*: (i) la trascrizione dei due geni avviene a partire dallo stesso promotore e la traduzione da uno stesso messaggero; (ii) la traduzione del gene *pol* è condizionata dalla frequenza con cui i ribosomi scorrono sul *frame* di lettura, a livello di una regione situata tra *gag* e *pol*; (iii) l'interazione strutturale tra i precursori Pr55Gag e Pr160GagPol è necessaria non solo per garantire l'assemblaggio di nuove particelle virali ma anche per la corretta attivazione degli enzimi virali durante il processo di maturazione.

Nei meccanismi di resistenza ai PIs è sempre più evidente che esiste una correlazione tra mutazioni che avvengono a carico della proteasi e sostituzioni amminoacidiche nei siti di taglio del precursore Pr55Gag. Queste relazioni sono state riscontrate sia in varianti virali resistenti selezionate *in vitro* da trattamento con PIs (Nijhuis *et al.*, 2007; Aoki *et al.*, 2009), sia *in vivo* in virus isolati da pazienti HIV-1 positivi per i quali la chemioterapia contenete PIs era fallita (Kolli *et al.*, 2006; Verheyen *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2011). Queste mutazioni sono in grado da sole di compensare ai difetti di attività catalitica dell'enzima indotti dalla comparsa di mutazioni primarie. Inoltre, sembrano predisporre pazienti naïve al fallimento di regimi terapeutici contenenti PIs, anche in assenza di altre mutazioni in proteasi (Larrouy *et al.*, 2010; Larrouy *et al.*, 2011; Parry *et al.*, 2011). Recentemente, sono state identificate alcune mutazioni al di fuori dei siti di taglio in Gag che si sono dimostrate essenziali per la replicazione di alcune varianti di HIV-1 in presenza di PIs (Gatanaga *et al.*, 2006; Parry *et al.*, 2011).

Sebbene sia ragionevole aspettarsi che ad un'alterazione nell'enzima possa corrispondere una modifica sul suo substrato, meno ovvio è l'impatto che mutazioni nella regione codificante la RT possono avere sul corretto processamento dei precursori Pr55Gag e Pr160GagPol. Studi *in vitro* hanno dimostrato che sostituzioni amminoacidiche a carico di RT possono alterare i meccanismi di processamento dei precursori poliproteici virali, con conseguente riduzione del rilascio e dell'infettività dei virioni neoformati (Chiang *et al.*, 2012), attraverso un meccanismo non ancora chiarito. È noto che la corretta dimerizzazione di RT è un fattore importante per la precisa attivazione di PR:

alcuni RTIs sono in grado di aumentare o diminuire la dimerizzazione di RT ed *in vitro* causano un aumento del processamento di Pr55Gag e Pr160GagPol, che si traduce in una perdita di infettività delle particelle neo-formate (Tachedjian *et al.*, 2005; Figueiredo *et al.*, 2006; Nishitsuji *et al.*, 2011; Chiang *et al.*, 2012).

Ad oggi rimane comunque da chiarire se mutazioni in *gag* abbiano uno specifico impatto *in vivo* sui meccanismi di resistenza ai farmaci antiretrovirali e se tale impatto sia indipendente o meno dall'effetto di queste mutazioni sulla capacità replicativa del virus. La definizione di questi processi potrebbe, non solo portare ad un miglioramento nella gestione clinica del paziente, ma anche contribuire a chiarire le relazioni funzionali che esistono tra le varie componenti virali.

4. SCOPO

La prevenzione della trasmissione ed il controllo dell'infezione da HIV-1 sono i principali obiettivi che i sistemi di sanità pubblica nazionali e le associazioni di volontariato mondiali si sono posti per ridurre la diffusione dell'AIDS. Con l'introduzione della HAART sono stati fatti numerosi passi avanti nella cura della malattia, riducendo la morbosità e la mortalità associate all'infezione da HIV-1 (Bhaskaran *et al.*, 2008). Il controllo dell'andamento dell'infezione che si ottiene con una adeguata terapia antiretrovirale è uno dei fattori determinanti per la contagiosità e la qualità della vita del paziente sieropositivo. A più di 30 anni di distanza dall'introduzione del primo farmaco antiretrovirale sono numerose le informazioni che si hanno a disposizione per migliorare i regimi terapeutici. La combinazione di più farmaci con diversi target terapeutici, il disegno di molecole di nuova generazione con elevata barriera genetica o con valenza multipla, in grado di ridurre fortemente la probabilità dello sviluppo di resistenze, sono i sistemi che vengono maggiormente studiati nel campo della ricerca farmacologica (Cane, 2009). Per questo è necessario conoscere in modo approfondito gli aspetti positivi e negativi delle terapie che attualmente sono in uso nella pratica clinica. Inibitori della trascrittasi inversa e della proteasi virali sono utilizzati da più di vent'anni e costituiscono ancora oggi lo *standard of care* della terapia dell'AIDS. Oggi sono ben noti gli effetti collaterali associati al loro utilizzo a lungo termine, come alterazioni del metabolismo lipidico e glicemico, della funzionalità renale ed epatica ed aumento del rischio di malattie cardiovascolari. Ugualmente sono molti i dati a disposizione riguardo il rischio di sviluppare resistenze ai trattamenti farmacologici. La maggior parte delle mutazioni che contrastano l'attività inibitoria dei farmaci risiedono nelle sequenze del genoma virale che codificano i target terapeutici (Menéndez-Arias, 2010). Per questo nella pratica clinica i test genotipici di resistenza sono limitati all'analisi delle sequenze codificanti i bersagli farmacologici della terapia (nella maggior parte dei casi, la regione del gene *pol* codificante PR e sito catalitico di RT) (Johnson *et al.*, 2010). Tuttavia spesso i sistemi diagnostici utilizzati per la rilevazione delle resistenze non sono in grado di evidenziare gli effetti di *pattern* mutazionali complessi o non sono sufficienti per spiegare il quadro clinico osservato nel paziente. Si rende quindi

indispensabile approfondire la rilevanza di altre sequenze del genoma virale, esterne alle regioni già prese in esame. Negli ultimi anni molti gruppi di lavoro hanno concordato sull'importanza svolta dalla regione del gene *gag* sullo sviluppo di farmacoresistenze, sia in termini compensatori sia predittivi del fallimento terapeutico (Verheyen *et al.*, 2006; Kolli *et al.*, 2009; Larrouy *et al.*, 2010; Larrouy *et al.*, 2011; Parry *et al.*, 2011; Shibata *et al.*, 2011). Ad oggi però non sono ancora chiari i ruoli svolti da specifiche regioni del precursore poliproteico Pr55Gag e l'effetto che mutazioni in singole posizioni amminoacidiche hanno sul ciclo biologico virale. A questo scopo, abbiamo voluto analizzare il contributo del gene *gag* sullo sviluppo delle resistenze in pazienti che hanno fallito la terapia basata su inibitori di PR e RT. In collaborazione con il Professor Parisi (Università degli Studi di Padova), abbiamo avuto accesso ai campioni clinici di pazienti HIV-1 positivi che afferiscono alla coorte Veneta CAVeAT, comprensiva di cinque Unità di Malattie Infettive. Sono state messe a punto le condizioni sperimentali per l'amplificazione ed il sequenziamento del gene *gag* proveniente da isolati virali appartenenti a diversi sottotipi. Per analizzare il contributo di specifiche parti del gene *gag* nel ciclo biologico virale è stata disegnata una strategia di clonaggio che, sfruttando la presenza di siti unici nel genoma provirale di HIV-1, permette l'inserimento dei prodotti di amplificazione derivati da paziente in vettori plasmidici che lo contengono. Inoltre, allo scopo di valutare l'infettività delle particelle virali ricombinanti abbiamo utilizzato un sistema di *trans*-complementazione, sviluppato in precedenza nel nostro laboratorio, che permette la pseudotipizzazione con *envelope* eterologhi espressi *in trans* di virioni competenti per un solo ciclo replicativo. Abbiamo quindi analizzato l'effetto di specifiche inserzioni a livello del dominio MA del Pr55Gag in termini di rilascio di particelle, processamento proteolitico del precursore Pr55Gag da parte della PR *wild type* ed efficienza di penetrazione intracellulare dei virioni ricombinanti.

5. MATERIALI E METODI

5.1. Materiali

5.1.1. Plasmidi

pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT: questo plasmide è stato ottenuto partendo dal plasmide pSVC21 vpu⁺vpr⁺nef⁺, inserendo una delezione di 580 pb a livello del gene *env* (posizione 7041-8621 di HXBc2), che rende il virus capace di un unico ciclo di replicazione. A livello del secondo esone di *rev* (posizione 8053 di HXBc2) è stato inserito il gene *reporter* Cloramfenicolo Acetil Transferasi (CAT), che viene espresso a partire dal promotore virus specifico 5'LTR. Questo plasmide presenta l'origine di replicazione di SV40, che permette l'efficiente amplificazione di plasmidi in cellule che esprimono costitutivamente l'antigene T di SV40. E' stato ottenuto nel nostro laboratorio.

pSVIIIenv: questo plasmide esprime i geni *env* e *rev* di HIV-1 sotto il controllo trascrizionale della 5'LTR di HIV-1. Il segnale di poliadenilazione è derivato da SV40. Sulla base della specifica sequenza nucleotidica clonata in questo plasmide sono stati ottenuti diversi costrutti, codificanti glicoproteine dell'*envelope* in grado di conferire diverso tropismo alle particelle che le espongono. In particolare, sono disponibili in laboratorio plasmidi pSVIIIenv codificanti gli envelope di HIV-1: HxBc2 (T-tropico adattato in laboratorio), ELI (T-tropico primario), ADA (macrofago-tropico) e 89.6 (primario dual-tropico).

pVSV-G: questo plasmide contenente il gene che codifica la glicoproteina G del virus della stomatite vescicolare (VSV-G) sotto il controllo trascrizionale del promotore *Immediate Early* del Citomegalovirus umano (HCMV), gentile concessione del Dott. T. Friedman (UCSD, San Diego).

pRev: questo plasmide contiene il gene *rev* di HIV-1 sotto il controllo trascrizionale del promotore IE di HCMV, gentile concessione del Dott. J. Sodroski (Harvard University, Boston).

Il mantenimento dei plasmidi in cellule procariotiche è consentito dalla presenza dell'origine di replicazione ColE1 e da un gene che codifica la resistenza all'ampicillina.

Per l'amplificazione dei plasmidi in cellule procariotiche è stato utilizzato il ceppo DH5 α di *E. coli* [*F'*/*endA1 hsdR17 (rk-mk+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (NaIr) relA1 Δ (lacIZYA-argF) U169 deoR (ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)] (Biolabs Inc.®) oppure il ceppo XL1-Blue di *Escherichia coli* (*supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac F' [proAB+, lac I^q, lacZ Δ M15, Tn10]*) (Stratagene®).*

I batteri sono stati coltivati in forma liquida in terreno Luria-Bertani (L.B.: Bactotriptone 1% (p/v), Estratto di lievito 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v)) in agitazione a 37°C o a 30°C a seconda del plasmide da amplificare. Quando necessario, il terreno è stato solidificato mediante aggiunta di agar 1.5% (p/v). Quando richiesto, è stato aggiunto l'antibiotico di selezione ampicillina alla concentrazione finale di 100 μ g/ml.

5.1.2. Linee cellulari

Per questo lavoro sperimentale è stata utilizzata la seguente linea cellulare:

293T: cellule embrionali renali umane, a morfologia stellata, che esprimono costitutivamente l'antigene proteico T del Virus Vacuolante della Scimmia (SV40) permettendo in questo modo un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici contenenti l'origine di replicazione di tale virus. La linea cellulare è stata gentilmente fornita dal Dott. D. Baltimore (Rockefeller University, New York).

Le cellule 293T sono state coltivate in terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) (Gibco) addizionato con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) (Gibco), inattivato a 56°C per 30 minuti.

La coltura cellulare è stata mantenuta in incubatore (Hereaus BDD 6220) alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5% (v/v) di CO₂ e sottoposta a periodici controlli per escludere eventuali contaminazioni.

5.1.3. Oligonucleotidi

Nella pratica clinica i test genotipici per HIV-1 adottati dalla Unità Operativa Complessa di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova prevedono l'amplificazione ed il sequenziamento della regione del gene *pol* codificante la proteasi e parte della trascrittasi inversa virali. La sequenza e le principali caratteristiche degli oligonucleotidi utilizzati sono riportati in Tabella 5.1., mentre lo schema rappresentativo della posizione è riportato in figura 5.1..

Nome del primer	Sequenza nucleotidica (5' ->3')	Posizione relativa HxBc2	Temperatura di annealing
PRO1	AAAAGGGCTGTTGGAAATGTG	2018-2038	50.5°C
P76	GARAGACAGGCTAATTTTATAGGA	2071-2095	52.3°C
P75	CTAAYTTCTGTATRTCATTGACAGTCCA	3303-3330	54.5°C
P87	CCTGSATAAATCTGACTTGCCCA	3345-3467	55.3°C

Tabella 5.1. Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione di parte del gene *pol* nei test genotipici e loro principali caratteristiche. Posizioni degenerate: R = A o G, Y = C o T, S = C o G.

Nelle reazioni di amplificazione a catena della polimerasi (PCR) e di sequenziamento del gene *gag* di HIV-1 sono stati utilizzati oligonucleotidi di innesco (*primers*) opportunamente disegnati e riportati in Tabella 5.2. Posizione e sequenza sono state ottimizzate in modo tale da amplificare e sequenziare la regione di interesse a partire da isolati virali di diverso sottotipo, secondo lo schema riportato in Figura 5.1. Le regioni del genoma virale più conservate sono state selezionate mediante la consultazione di dati di letteratura (McKinnon *et al.*, 2001; Piantadosi *et al.*, 2007; Bennet *et al.*, 2009; Piantadosi *et al.*, 2009; Callegaro *et al.*, 2011) e l'utilizzo di programmi bioinformatici di allineamento multiplo, quali Mega4 e ClustalW2. Le sequenze utilizzate nelle analisi bioinformatiche sono state selezionate sulla base dei dati aggiornati sulla

prevalenza dei sottotipi circolanti in Italia e recuperate dalla banca dati di sequenza del *Los Alamos National Laboratory* (disponibile al sito <http://www.hiv.lanl.gov>).

Nome del primer	Sequenza nucleotidica (5'→3')	Posizione relativa a HxBc2	Temperatura di annealing
G1	TAAGCCTCAATAAAGCTTGCC	519-539	62.0°C
G2	TAGTGTGTGCCCRTCTGTTGT	554-574	68.6°C
G3	GACCARCAAGGTKTCTGTCATCCA	1735-1758	62.5°C
G4	GCTGTCATCATTTCTARTGWAGC	1810-1835	66.2°C
G5	GAGCCACYCCACAAGATTTAAA	1322-1342	61.9°C
G6	ACYATCAATGAGGAAGCTGCAGA	1399-1421	64.2°C
G7	TYATCTGCTCCTGTRCTAATA	2320-2341	42.2°C
G8	TCCAATTCCYCCTATCATTTTTGG	2382-2405	65.6°C

Tabella 5.2. Oligonucleotidi disegnati ed utilizzati per l'amplificazione del gene *gag* e loro principali caratteristiche. Posizioni degenerate: R = A o G, K = G o T, Y = C o T, W = A o T.

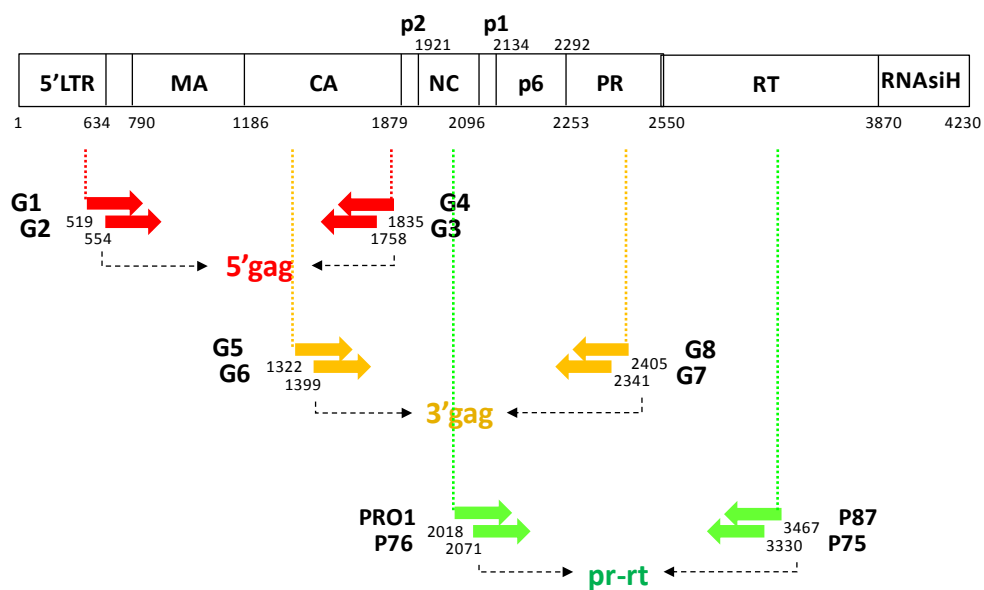


Figura 5.1. Rappresentazione schematica della posizione degli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione del gene *gag* e di parte del gene *pol*.

Nelle reazioni di amplificazione e di sequenziamento della regione del gene *env* di HIV-1 codificante la gp41 sono stati utilizzati gli oligonucleotidi opportunamente disegnati e riportati in Tabella 5.3. Come per il gene *gag*, posizione e sequenza sono state definite sulla base dei dati disponibili sulle regioni conservate considerando isolati virali di diverso sottotipo ed utilizzando i programmi bioinformatici di allineamento multiplo Mega4 e ClustalW2.

Nome del primer	Sequenza nucleotidica (5'→3')	Posizione relativa a HxBc2	Temperatura di annealing
P1	AGCAATGTATGCYCCTCCYAT	7520-7540	59.5°C
P2	GAYAATTGGAGAAGTGAATTATA	7653-7675	53.4°C
P3	CCACCTYCTTCTTCTATTC	8419-8437	46.5°C
P4	CTGAAGAGGCACAGGCTCC	8506-8524	65.2°C
P5	GGCAARTYTGTGGARTTGGTTT	8222-8243	65.5°C
P6	TGGTATATAARAWTATTYATAA	8262-8281	38.2°C
P7	ACCTGRGGYGTGACTGGAAA	8998-9017	63.2°C
P8	TCCAGTCCCCCCTTTTCTTTTA	9068-9089	66.4°C

Tabella 5.3. Oligonucleotidi disegnati ed utilizzati per l'amplificazione della parte del gene *env* codificante la gp41 e loro principali caratteristiche. Posizioni degenerate: Y = C o T, R = A o G, W = A o T.

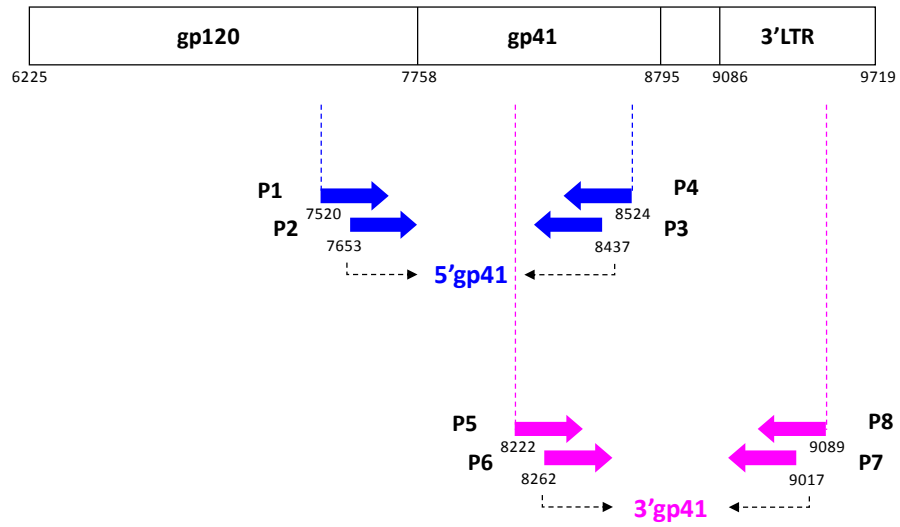


Figura 5.2. Rappresentazione schematica della posizione degli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione della regione codificante la glicoproteina dell'*envelope* gp41.

5.2. Metodi

5.2.1. Quantificazione degli acidi nucleici

Quando necessario, la quantità di RNA estratto o di DNA plasmidico è stata determinata allo spettrofotometro (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, Thermo Scientific®) mediante lettura della densità ottica (D.O.) di diluizioni degli acidi nucleici alla lunghezza d'onda di 260 nm, corrispondente al massimo picco di assorbimento per le basi azotate. La concentrazione del DNA è stata ricavata grazie alla legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon * l * C$$

dove A è l'assorbanza del campione, ε è il coefficiente di estinzione molare (pari a $6600 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ per il DNA a doppio filamento e $6220 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ per l'RNA a singolo filamento), l è la lunghezza del cammino ottico (pari a 0.1 cm) e C la concentrazione dell'acido nucleico in soluzione. La presenza di eventuali contaminazioni di tipo proteico è stata rilevata analizzando la lunghezza d'onda di 280 nm, alla quale il legame peptidico presenta il picco massimo di assorbimento. Sono state considerate pure le preparazioni in cui il rapporto A260/A280 era compreso tra i valori 1.8 e 2.0.

5.2.2. Estrazione dell'RNA virale da plasma di pazienti HIV-1 positivi

I campioni ematici, ottenuti da pazienti HIV-1 positivi, sono stati raccolti in provette (Vacutainer) contenenti anticoagulante (EDTA) e mantenuti in ghiaccio fino al momento del processamento. Successivamente i campioni sono stati separati in plasma e cellule mediante centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti su gradiente di Ficoll-Paque Plus (Amershan Biosciences). La fase superiore (plasma) è stata sottoposta ad ulteriore centrifugazione a 13000 rpm per un'ora a 4°C al fine di precipitare le particelle virali di HIV-1. L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata impiegando il kit "*QIAamp Viral RNA*" (QIAGEN) basato sull'utilizzo di colonne a scambio anionico. Brevemente, la metodica prevede la

lisi iniziale del precipitato virale con uno specifico tampone, contenente agenti caotropici, ed il successivo trasferimento in colonna del lisato ottenuto. L'RNA associato ai siti funzionali della resina è stato poi purificato tramite lavaggi successivi con opportuni tamponi a bassa concentrazione salina. L'eluizione dalla colonna dell'RNA totale così ottenuto è stata eseguita utilizzando un tampone ad elevata concentrazione salina in un volume pari a 50 µl.

5.2.3. Analisi genotipica dei campioni HIV-1 positivi

La retrotrascrizione e l'amplificazione di parte del gene *pol* a partire dagli estratti ottenuti come descritto al Paragrafo 5.2.2. sono state eseguite utilizzando il sistema SuperScript™ III One-Step RT-PCR (Invitrogen) e gli oligonucleotidi riportati in Tabella 5.2. (Peduzzi *et al.*, 2002). Il sistema SuperScript™ III One-Step RT-PCR (Invitrogen) è basato sull'utilizzo di una miscela di due enzimi: i) la retrotrascrittasi *SuperScript™ III* del virus della leucemia murina (MLV) modificata per ridurre l'attività endonucleasica del dominio RNAsi H ed aumentarne la stabilità termica; ii) una DNA polimerasi *Taq* ad alta fedeltà inattiva a temperatura ambiente, in quanto complessata con uno specifico anticorpo ma in grado di riacquistare la capacità di sintesi in seguito ad un ciclo di denaturazione a 94°C. I prodotti della prima reazione sono stati poi sottoposti ad un secondo ciclo di PCR-Nested, in modo tale da ottenere ampliconi corrispondenti alla regione codificante PR ed i primi 324 codoni della RT di HIV-1. Per l'identificazione delle mutazioni di resistenza è stato utilizzato il kit *TruGene HIV-1 genotyping* (Bayer Health Care LLC), un sistema semi-automatico di sequenziamento e genotipizzazione del gene *pol* di HIV-1.

5.2.4. Predizione della suscettibilità ai farmaci antiretrovirali ed analisi del sottotipo

La definizione del profilo di resistenza e dell'impatto delle mutazioni evidenziate dall'analisi di sequenza sulla HAART è stata ottenuta utilizzando il sistema bioinformatico *Stanford HIVdb drug-resistance algorithm*, versione 4.2.6 (disponibile al sito <http://hivdb.stanford.edu>). In particolare, questo programma è in grado di restituire, una volta sottomessa la sequenza nucleotidica della regione di interesse del gene *pol*, un profilo di resistenza mediante l'assegnazione a ciascuna delle mutazioni individuate un punteggio specifico per ogni inibitore. In questo modo, la combinazione di tutte le resistenze osservate in un unico isolato virale permette di classificare ciascun campione clinico in uno dei cinque livelli di suscettibilità ai farmaci, ovvero: (i) suscettibile, (ii) con potenziale basso livello di resistenza, (iii) con bassi livelli di resistenza, (iv) con resistenza intermedia, (v) altamente resistente (Rhee *et al.*, 2003).

L'analisi del sottotipo è stata eseguita utilizzando il programma *Rega Institute subtyping tool*, versione 2.0, disponibile al sito <http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping/>.

5.2.5. Reazioni di retrotrascrizione ed amplificazione dell'intero gene *gag*

Per l'amplificazione del gene *gag* a partire da isolati virali di HIV-1 sono state utilizzate le seguenti coppie di oligonucleotidi, disegnate in questo lavoro di tesi (Tabella 5.2., figura 5.1): G1 e G4 come *primers* esterni e G2 e G3 come *primers* interni per l'amplificazione della regione 5' del gene *gag*; G5 e G8 come *primers* esterni e G6 e G7 come *primers* interni per l'amplificazione della regione 3' del gene *gag*. I *primers* sono stati disegnati in modo tale da ottenere prodotti di PCR di circa 1.0 kpb, come indicato in figura 5.1.

I campioni di RNA estratti dal plasma di pazienti HIV-1 positivi sono stati sottoposti ad un primo ciclo di amplificazione utilizzando le coppie di oligonucleotidi esterni (G1 e G4, G5 e G8) in un'unica reazione di retrotrascrizione ed amplificazione. In particolare, è stata allestita un'unica reazione contenente: 10 µl dell'RNA estratto, 17.5 µl della miscela di reazione

2X, 0.7 µl di ciascun oligonucleotide di innesco alla concentrazione di 10 µM, 0.4 µl dell'enzima SuperScript™ III RT/ Platinum® *Taq* High Fidelity, 1.75 µl di 100% DMSO ed acqua milliQ fino al volume finale di 35 µl. Le seguenti condizioni di amplificazione sono state ottimizzate per ottenere la massima specificità e resa: la retrotrascrizione dell'RNA a cDNA è stata ottenuta incubando la miscela di reazione a 45°C per 50 minuti, seguita da una fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti in cui la *Taq* polimerasi veniva attivata; il programma di amplificazione ha previsto 5 cicli di denaturazione a 95°C per 15 secondi, appaiamento degli oligonucleotidi a 52°C per 30 secondi ed estensione a 68°C per 1 minuto, seguito da 35 cicli di denaturazione a 95°C per 15 secondi, appaiamento a 58°C per 30 secondi ed estensione a 68°C per 1 minuto.

Per aumentare la resa e la specificità dell'amplificazione è stata eseguita una PCR-Nested allestendo una reazione composta da 5 µl del prodotto di amplificazione ottenuto nella reazione precedente, 5 µl di *10x PfuUltra HF reaction buffer* (Stratagene®), 2.5 µl di ciascuno degli opportuni oligonucleotidi innesco (10 µM), 5 µl di dNTPs (100 mM), 0.5 µl di *PfuUltra™ High-Fidelity* DNA polimerasi (2.5 U/µl) (Stratagene®) ed acqua deionizzata fino ad un volume di 50 µl. Per l'amplificazione con i *primers* G6 e G7 è stato aggiunto MgCl₂ alla concentrazione finale di 3mM e DMSO alla concentrazione finale di 5% (v/v). In questa reazione di amplificazione è stata utilizzata una DNA polimerasi ad alta fedeltà (attività esonucleasica 3'→5') ed indicata per l'amplificazione di lunghi frammenti di DNA (fino a 22 Kb). La reazione di PCR-Nested è stata eseguita in un termociclatore (Termal Cycler 2400 Perkin Elmer) impostando una prima fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti, seguita da 5 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi, appaiamento a 56°C per 1 minuto ed estensione a 72°C per 1 minuto, seguito da 35 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi, appaiamento a 62°C per 1 minuto ed estensione a 72°C per 1 minuto.

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati caricati su gel d'agarosio 1% (p/v) utilizzando marcatori di peso molecolare noto (Roche/Boehringer) per verificare la specificità e le dimensioni del frammento ottenuto. Gli amplificati sono stati poi opportunamente purificati e sottoposti a sequenziamento.

5.2.6. Reazioni di retrotrascrizione ed amplificazione della regione del gene *env* codificante la gp41

Per l'amplificazione della regione codificante la glicoproteina di superficie gp41 a partire dall'RNA estratto da plasma di pazienti HIV-1 positivi sono state utilizzate le seguenti coppie di oligonucleotidi, disegnate in questo lavoro di tesi (Tabella 5.3., figura 5.2.): P1 e P4 come *primers* esterni e P2 e P3 come *primers* interni per l'amplificazione della regione 5' e P5 e P8 come *primers* esterni e P6 e P7 come *primers* interni per l'amplificazione della regione 3' della regione codificante la gp41. Gli oligonucleotidi sono stati disegnati in modo tale da ottenere prodotti di PCR di circa 1.0 kpb, come indicato in figura 5.2.

Il sistema utilizzato è lo stesso descritto nel paragrafo precedente (Paragrafo 5.2.5.) per l'amplificazione ed il sequenziamento di *gag*, con alcune modifiche. Brevemente, l'RNA estratto è stato sottoposto ad un primo ciclo di retrotrascrizione ed amplificazione utilizzando le coppie di oligonucleotidi esterni (P1 e P4, P5 e P8) in un'unica reazione, secondo la ricetta riportata nel paragrafo precedente. Le condizioni di amplificazione sono state ottimizzate per ottenere la massima specificità e resa: in particolare, la retrotrascrizione dell'RNA a cDNA è stata ottenuta incubando la miscela di reazione a 45°C per 50 minuti, seguita da una fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti in cui la *Taq* polimerasi veniva attivata; il programma di amplificazione ha previsto 5 cicli di denaturazione a 95°C per 15 secondi, appaiamento degli oligonucleotidi a 56°C per P1 e P4 o a 46°C per P5 e P8 per 30 secondi ed estensione a 68°C per 1 minuto, seguito da 35 cicli di denaturazione a 95°C per 15 secondi, appaiamento a 60°C per P1 e P4 o a 52°C per P5 e P8 per 30 secondi ed estensione a 68°C per 1 minuto.

Per aumentare la resa e la specificità dell'amplificazione è stata eseguita una PCR-Nested allestendo una reazione composta dalla stessa miscela riportata nel paragrafo precedente (Paragrafo 5.2.5.). Per l'amplificazione con i *primers* P6 e P7 è stato aggiunto MgCl₂ alla concentrazione finale di 3mM e DMSO alla concentrazione finale di 5% (v/v). La reazione di PCR-Nested è stata eseguita impostando una prima fase di denaturazione a 95°C per 5 minuti, seguita da 5 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi, appaiamento a 48°C per P2 e P3 o 46°C per P6 e P7 per 1 minuto ed estensione a 72°C per 1 minuto, seguito da 35

cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi, appaiamento a 56°C per P2 e P3 o 52°C per P6 e P7 per 1 minuto ed estensione a 72°C per 1 minuto.

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati caricati su gel d'agarosio 1% (p/v) utilizzando marcatori di peso molecolare noto (Roche/Boehringer) per verificare la specificità e le dimensioni del frammento ottenuto. Gli amplificati sono stati poi opportunamente purificati e sottoposti a sequenziamento.

5.2.7. Sequenziamento dei prodotti di PCR e dei plasmidi

I prodotti di PCR ed i costrutti ottenuti in questo lavoro di tesi sono stati analizzati, non solo mediante caricamento su gel di agarosio ed eventuale restrizione enzimatica, ma anche tramite sequenziamento. A tal fine, è stato utilizzato il kit “*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystem), basato sul metodo di Sanger modificato (Sanger *et al.*, 1977), in cui si utilizza la DNA polimerasi AmpliTaq® per sintetizzare copie di DNA a singolo filamento. Nella miscela di reazione, oltre ai quattro deossinucleotidi trifosfato (dNTPs), è stata aggiunta una miscela di dideossinucleotidi trifosfato (ddNTPs), ognuno dei quali è coniugato ad un diverso cromoforo. Tali gruppi, legati ai ddNTPs per non interferire stericamente con la reazione di polimerizzazione, quando eccitati alla stessa lunghezza d'onda di 448 nm, sono in grado di emettere fluorescenza a lunghezze d'onda diverse comprese tra 500 nm e 700 nm. Si ottiene così una serie di filamenti di DNA di sequenza complementare allo stampo, interrotti in punti casuali dai ddNTPs fluorescenti. I diversi frammenti vengono quindi separati per gel elettroforesi capillare e rilevando la lunghezza d'onda di emissione associate ai diversi dideossinucleotidi è possibile ricostruire la sequenza del DNA in analisi.

Per i prodotti di PCR, è stato necessario far precedere alla reazione di sequenziamento una fase di purificazione degli amplificati dai contaminanti costituiti dall'eccesso di *primers* e nucleotidi rimasto dalla reazione di amplificazione. Per questo, a seconda della resa, 5 o 10 µl del prodotto di PCR sono stati incubati con 2 µl di ExoSap-IT® (USB), una miscela di due enzimi (*Exonuclease I/Shrimp Alkaline Phosphatase*) in grado di degradare frammenti di DNA di dimensioni inferiori alle 100 pb. L'amplificato da purificare è stato

incubato a 37°C per 30 minuti e a 80°C per 15 minuti per inattivare gli enzimi. Il prodotto di PCR purificato è stato portato ad un volume finale di 16 µl e suddiviso in due aliquote, ciascuna utilizzata in una reazione di sequenziamento separata, contenente 2 µl *primer* di innesco alla concentrazione 1 µM, 3 µl di buffer 5X (Tris-HCl 200 mM, pH 9, MgCl₂ 5 mM), 2 µl della miscela del kit ed acqua milliQ per arrivare a volume.

Per il sequenziamento di DNA plasmidico, la reazione è stata allestita in un volume finale di reazione di 10 µl contenente: 300 ng di DNA estratto dalle preparazioni plasmidiche, il *primer* di innesco alla concentrazione 1 µM, 1 µl di buffer 5X (Tris-HCl 200 mM, pH 9, MgCl₂ 5 mM), 1 µl della miscela del kit ed acqua milliQ per arrivare a volume.

A seconda delle necessità, come inneschi sono stati utilizzati opportuni oligonucleotidi riportati nelle Tabelle 5.1., 5.2. o 5.3.

Sono stati effettuati 35 cicli di amplificazione in termociclatore, comprendenti una fase di denaturazione a 95°C per 10 secondi, una fase di appaiamento degli oligonucleotidi a 50°C per 10 secondi e una fase di elongazione a 62°C per 4 minuti. Allo scopo di denaturare il DNA stampo e di attivare la polimerasi, i 35 cicli sono stati preceduti da un'incubazione delle miscele di reazione a 95°C per 10 minuti. I campioni sono stati mantenuti a 4°C fino al momento della purificazione. Il prodotto della reazione di sequenziamento è stato precipitato in presenza di 1/10 del volume di sodio acetato 3M pH 4.6 e 2 volumi di etanolo e risospeso in acqua.

L'elettroforesi capillare dei prodotti di estensione è stata eseguita nel sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem).

5.2.8. Restrizioni enzimatiche

In questo lavoro sperimentale, le diverse reazioni di restrizione dei prodotti di PCR o del DNA plasmidico sono state effettuate utilizzando gli opportuni enzimi (Biolabs®) nei rispettivi tamponi di reazione. Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dell'enzima (in genere 37°C) per il tempo richiesto, a seconda del tipo di enzima e delle quantità di DNA da digerire. Al termine della digestione, i campioni sono stati diluiti in colorante [Glicerolo al 5% (p/v), Blu di

bromofenolo 0,15% (p/v), Xilene cianolo allo 0,02% (p/v) e EDTA 0,002 M] al fine di visualizzare il fronte di migrazione della corsa elettroforetica e facilitare l'entrata del campione di DNA nel pozzetto d'agarosio all'1% (p/v) (Seakem). Al gel d'agarosio è stato addizionato bromuro di etidio (0,5 µg/ml), molecola fluorescente che si intercala fra le basi di DNA, rendendolo visibile quando irradiato con luce UV. Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato il tampone salino TBE 1X (Tris-borato 0,009 M, EDTA 1 mM pH 8). Inoltre, per verificare la corretta dimensione dei frammenti sono stati utilizzati opportuni marker di peso molecolare noto, tra cui il *Marker VII* (0,25 µg/ml; bande di dimensioni 8576, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, 710, 492, 359 pb); il *Marker II* (0,25 µg/ml; bande di dimensioni 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 pb); e il *Marker VIII* (0,25 µg/ml; bande di dimensioni 1114, 900, 692, 501, 489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110, 67, 37, 34, 26, 19 pb) (Roche/Boehringer).

5.2.9. Competenza e trasformazione batterica

I plasmidi e i prodotti delle reazioni di ligazione sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule batteriche *E. coli*, ceppo DH5α oppure ceppo XL1-Blue, rese artificialmente competenti mediante la tecnica del cloruro di calcio.

La competenza batterica è stata ottenuta facendo crescere le colonie batteriche a 37°C in 3 ml di terreno liquido LB contenente MgCl₂ 15 mM, in assenza di antibiotico per circa 12 ore. In seguito l'inoculo è stato trasferito in 400 ml dello stesso terreno. Una volta raggiunta la densità ottica di 0.4 alla lunghezza d'onda di 600 nm, la coltura è stata raffreddata in modo rapido in ghiaccio al fine di interrompere la crescita batterica; i batteri sono stati quindi sedimentati per centrifugazione a 3500 rpm a 4°C per 15 minuti e risospesi in una soluzione fredda contenente MnCl₂-4H₂O 10 mM, CaCl₂ 50 mM, MES [2-(*N-morpholino*) ethanesulfonic acid] 10 mM pH 6.3. I batteri sono stati poi ricentrifugati, delicatamente risospesi in 10 ml della medesima soluzione fredda addizionata di glicerolo al 15% (v/v) e quindi aliquotati e conservati a -80°C.

La trasformazione batterica è stata effettuata aggiungendo il DNA plasmidico (100-300 ng) oppure i prodotti di ligazione a 50 µl di batteri competenti,

incubando poi in ghiaccio per 30 minuti. In seguito i batteri sono stati sottoposti a *shock* termico mediante esposizione a 37°C per 2 minuti, raffreddati in ghiaccio e incubati a 37°C per un'ora in 200 µl di LB, consentendo così l'espressione e la sintesi della proteina che conferisce la resistenza all'antibiotico di selezione. Infine, tutta la sospensione è stata seminata in piastre Petri contenenti LB-Agar addizionato con ampicillina 100 µg/ml e incubata 16 ore a 37°C al fine di selezionare i batteri trasformati.

5.2.10. Preparazione di DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato estratto dal ceppo DH5α oppure dal ceppo XL1-Blue di *E. coli* con il metodo della lisi alcalina applicato per preparazioni plasmidiche in piccola scala (*miniprep*) per piccoli volumi di coltura batterica (1-2 ml). Questa procedura utilizza il potassio acetato ad elevata molarità (5 M) per precipitare le molecole di DNA ad alto peso molecolare. Il DNA così ottenuto è stato precipitato con alcool etilico e successivamente risospeso in TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8) contenente RNAsi pancreatica 20 µg/ml.

Per ottenere preparazioni plasmidiche ad elevato grado di purezza e in grande scala (*maxiprep*) adatte alla trasfezione delle cellule eucariotiche, il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il “*QIAGEN Plasmid MAXI Kit*” basato sull'utilizzo di colonne a scambio anionico QIAGEN®. Attraverso questo procedimento il DNA plasmidico si lega alla resina della colonna utilizzando tamponi a bassa concentrazione salina, mentre viene purificato da RNA, proteine e impurità ad alto peso molecolare. Il DNA plasmidico viene poi eluito dalla colonna per mezzo di tamponi ad elevata concentrazione salina. Il plasmide, in seguito, viene concentrato e pulito da sali mediante precipitazione con isopropanolo e lavaggio con etanolo al 70% (v/v).

Il DNA ottenuto è stato controllato mediante sequenziamento e/o restrizione enzimatica (Paragrafi 5.2.7. e 5.2.8.), mentre la presenza di eventuali contaminazioni e la resa è stata valutata tramite tecniche spettrofotometriche (Paragrafo 5.2.1.).

5.2.11. Tecniche di clonaggio

La strategia di clonaggio prevede di ottenere il frammento da clonare mediante restrizione enzimatica a partire dal prodotto di PCR o dal plasmide appropriato. Alla fine della reazione la miscela viene sottoposta a corsa elettroforetica in gel d'agarosio per controllare la corretta dimensione dei frammenti, mediante l'utilizzo di *marker* di peso molecolare noto. Il frammento di gel, contenente la banda corretta, viene inciso con un bisturi ed il DNA è stato purificato attraverso l'uso del kit QIAGEN® *QIAquick gel extraction kit*. Questo sistema si basa sulla solubilizzazione dell'agarosio e sul successivo legame specifico degli acidi nucleici alla membrana di silice-gel di una colonna a scambio anionico in presenza di un agente caotropico. La separazione finale del DNA linearizzato da sali ed enzimi è resa possibile attraverso una serie di eluizioni progressive. Dopo il taglio enzimatico, la sequenza è inserita nel plasmide opportuno, anch'esso trattato mediante reazione enzimatica per permettere l'introduzione del frammento. Per tale scopo è usata la DNA ligasi del batteriofago T4 (4x10⁵ U/ml) (Biolabs), enzima in grado di catalizzare *in vitro* la formazione di legami fosfodiesterici tra il residuo fosfato in 5' ed il gruppo idrossilico in 3' delle estremità adiacenti. Le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 10 µl, impiegando 1 unità di ligasi e incubate a 16°C per 16 ore.

Le quantità di vettore ed inserto da utilizzare nella reazione di ligazione vengono determinate utilizzando la seguente formula:

$$X \text{ (ng)} = [Y \text{ pb} \times 300 \text{ ng}] / V \text{ pb}$$

Dove: X = ng inserto,

Y pb = paia di basi dell'inserto,

300 ng = 300 ng di vettore,

V pb = paia di basi del vettore plasmidico.

I prodotti di ligazione sono poi utilizzati per la trasformazione dei batteri come descritto nel Paragrafo 5.2.9.

Le colonie resistenti all'ampicillina vengono incubate in 5 ml di terreno LB, in presenza di antibiotico (100 µg/ml), e fatte crescere 16 ore a 37°C in agitazione.

La presenza del DNA plasmidico viene verificata usando il protocollo delle *miniprep* (Paragrafo 5.2.9.). Successivamente il DNA plasmidico viene controllato mediante restrizione enzimatica, gel elettroforesi e sequenziamento (Paragrafi 5.2.7. e 5.2.8.).

5.2.11.1 Schema sperimentale della strategia di clonaggio delle regioni 5' e 3' dei geni *gag* derivate da pazienti nel vettore pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT derivato da HIV-1

Allo scopo di determinare il contributo della proteina Gag nello sviluppo di resistenze e la sua specifica funzione nel ciclo replicativo di virus mutanti, è stata disegnata una strategia di clonaggio che permette di analizzare il contributo differenziale della regione ammino-terminale o carbossi-terminale di Gag in presenza o meno degli enzimi PR-RT mutati (Figura 5.3.). Con questo sistema ciascun prodotto di amplificazione ottenuto da paziente può essere inserito direttamente in un genoma provirale di HIV-1, sfruttando la presenza di siti di restrizione unici sia nel frammento di PCR sia nel vettore. In particolare, è stata utilizzata una versione modificata del sistema di *trans*-complementazione già descritto in precedenza (Helseth *et al.*, 1990; Parolin *et al.*, 2003), in cui il provirus che presenta una delezione di 580 bp nella regione del gene *env* è in grado di esprimere il gene *reporter* della Cloramfenicolo Acetil Transferasi (CAT) sotto il controllo trascrizionale della 5'LTR virale (pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT) ed è quindi capace di un unico ciclo di replicazione. Esso è in grado di esprimere sia le componenti strutturali sia enzimatiche dalla particella, avendo i geni *gag* e *pol* intatti. Inoltre questo vettore ricombinante contiene tutti i geni accessori del virus, fatta eccezione di *rev*. *Rev* è essenziale durante la replicazione per il trasporto dal nucleo al citoplasma dei lunghi trascritti virali contenenti la sequenza RRE e quindi deve essere fornita *in trans*. Sebbene la proteina Gag sia in grado da sola di dirigere la formazione di *Virus-Like Particles* (VLPs) (Campbell and Vogt, 1995), la delezione introdotta nel gene *env* rende necessario fornire *in trans* le glicoproteine dell'*envelope* per

produrre particelle lentivirali infettive. La necessità co-trasfettare le cellule i plasmidi derivati da pSVIIIenv rende possibile ottenere particelle con diverso tropismo a seconda del tipo di plasmide utilizzato per la co-trasfezione. In laboratorio sono infatti disponibili plasmidi esprimenti glicoproteine dell'*envelope* di HIV-1 con diverso tropismo, T-tropiche, Macrofago tropiche e dual-tropiche. La produzione di particelle lentivirali ottenute con questo sistema può essere valutata mediante saggio di attività retrotrascrittasi (o *RT assay*). La trasduzione delle cellule bersaglio viene eseguita utilizzando la stessa quantità di virioni ricombinanti, parificati in termini di unità di retro trascrizione. In questo modo è possibile valutare l'infettività delle particelle ricombinanti in termini di attività acetil-transferasica prodotta dall'espressione del gene CAT. Le proteine virali sono espresse in un contesto simile a quello del virus *wild type* e ci si aspetta quindi che anche il livello di espressione del gene *reporter* sia comparabile a quello dei geni virus-specifici.

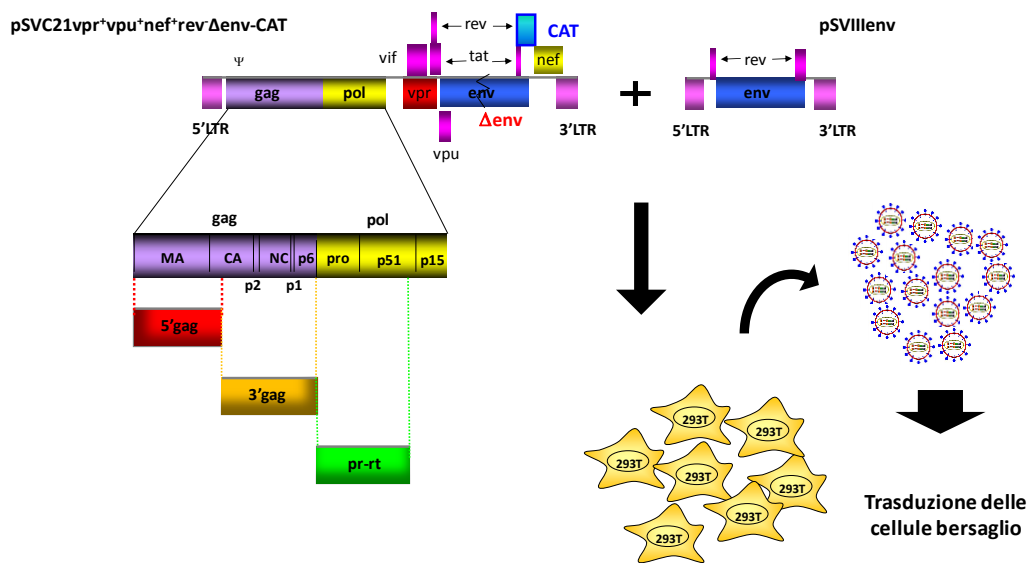


Figura 5.3. Rappresentazione schematica del sistema utilizzato per la produzione di particelle virali ricombinanti basate su HIV-1. All'interno del vettore lentivirale pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT possono essere clonati direttamente i prodotti di PCR ottenuti dall'amplificazione di specifiche regioni di *gag* o *pol* a partire dall'RNA virale estratto.

5.2.11.2. Ottenimento del costrutto esprimente la regione 5'*gag* derivata dal paziente in un contesto provirale

L'RNA estratto dal plasma del paziente HIV-1 positivo selezionato (Paragrafo 5.2.2.) è stato retrotrascritto ed amplificato attraverso due reazioni sequenziali di retrotrascrizione-amplificazione e PCR-Nested (Paragrafo 5.2.5.), utilizzando gli opportuni *primer* (Tabella 5.2.). Il prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione della regione 5' del gene *gag* è stato sottoposto a restrizione enzimatica (come descritto nel Paragrafo 5.2.8.), utilizzando le endonucleasi BssHII e SpeI, che riconoscono siti unici presenti sia nel frammento di PCR sia nel DNA provirale di HIV-1. Dopo aver preparato allo stesso modo il plasmide di destinazione pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT, è stata allestita la reazione di ligazione (Paragrafo 5.2.10.). I costrutti ottenuti sono stati controllati mediante sequenziamento della regione 5'*gag*, utilizzando gli oligonucleotidi G2 e G3.

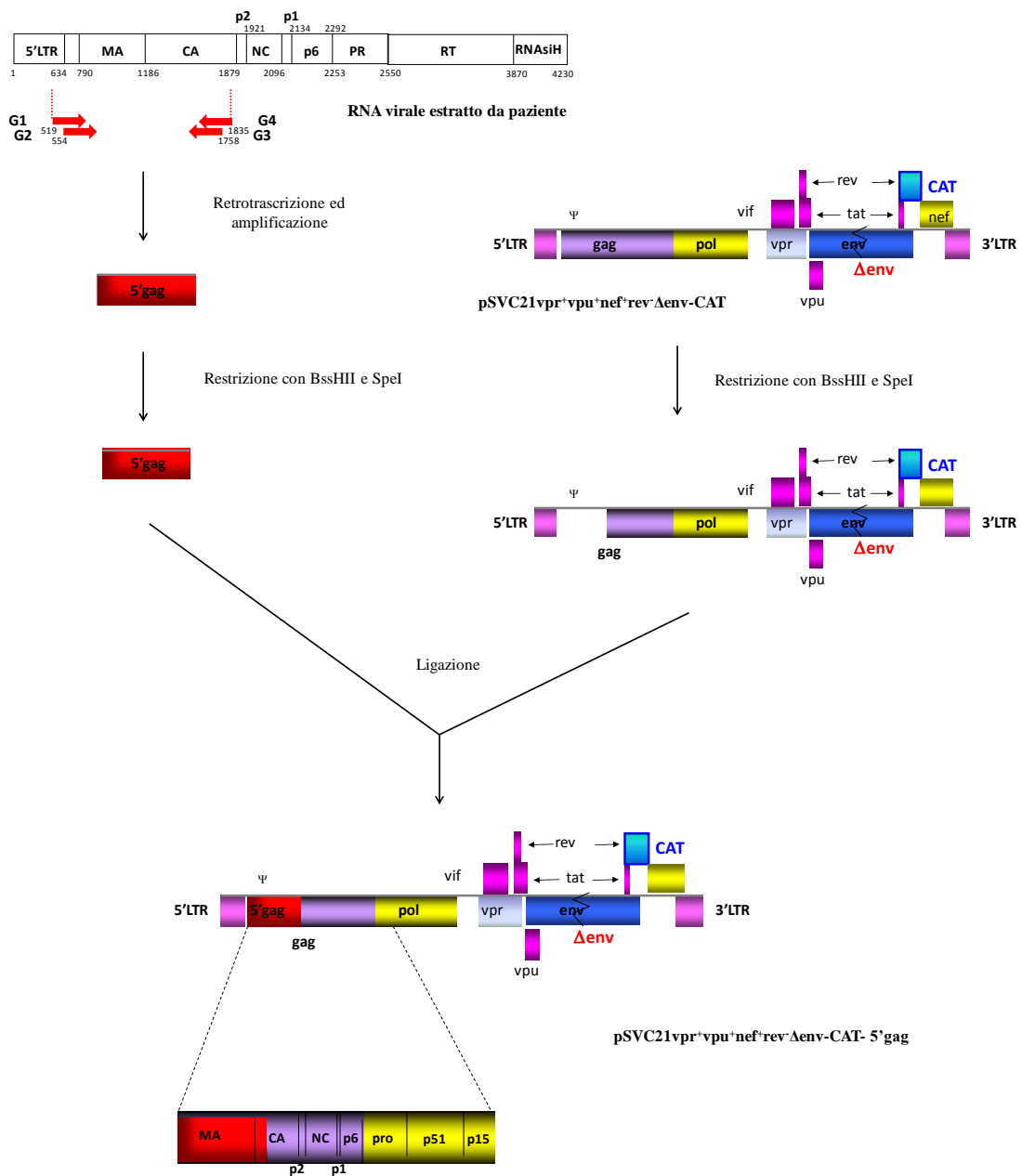


Figura 5.4. Rappresentazione schematica dell'ottenimento del costrutto pSVC21vr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT-5'gag mediante ligazione del plasmide contenente il DNA provirale modificato di HIV-1, su cui di basa il sistema di *trans*-complementazione riportato in figura 5.3., con il prodotto di PCR ottenuto dall'amplificazione della regione 5' del gene *gag* a partire dall'RNA estratto da plasma del paziente 304.

5.2.12. Tecniche di trasfezione

Nel presente lavoro sperimentale è stata impiegata la tecnica del calcio fosfato per introdurre DNA esogeno all'interno delle cellule. Nello specifico, 24 ore prima della trasfezione cellule 293T sono state seminate alla densità di 2.5×10^6 in dischi da 100 mm di diametro (Falcon) in 11 ml di terreno DMEM completo. Il giorno successivo le cellule sono state trasfettate con 5 μg dei plasmidi esprimenti l'opportuno DNA provirale di HIV-1 e, quando richiesto, con 1 μg del plasmide pRev e 3 μg del plasmide codificante l'*envelope* virale (pSVIIIenv o pVSV-G). Alle soluzioni costituite da DNA risospeso in TE 1/10 e CaCl_2 sono stati aggiunti 500 μl di HPB2X pH 7.1 (NaCl 280 mM, HEPES 50 mM pH 7.1, Na_2HPO_4 1.5 mM). Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, la sospensione è stata trasferita nel mezzo di coltura delle cellule. A 6 ore dalla trasfezione, le cellule sono state sottoposte a 2 lavaggi con terreno DMEM completo e, infine, incubate con 11 ml di terreno DMEM completo. La raccolta delle cellule trasfettate e dei relativi surnatanti è stata effettuata a diversi tempi, 16, 24 o 48 ore dopo la trasfezione, a seconda del disegno sperimentale. Negli esperimenti di trasfezione di cellule 293T svolti al fine di indagare l'effetto della regione 5'*gag* derivata dal paziente sul processamento del precursore poliproteico Pr55Gag, il protocollo di trasfezione precedentemente descritto è stato ottimizzato in modo da esprimere la minima quantità di proteine necessaria per la rivelazione. In particolare, le cellule 293T sono state seminate alla densità di 1.5×10^6 in T25 (Falcon) in 4 ml di terreno DMEM completo, 24 ore prima della trasfezione. Il giorno successivo le cellule sono state trasfettate con 1.5 μg dei plasmidi esprimenti l'opportuno DNA provirale di HIV-1 e con 0.04 μg del plasmide pRev. Alle soluzioni costituite da DNA risospeso in TE 1/10 e CaCl_2 sono stati aggiunti 160 μl del tampone HPB2X pH 7.1. Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, la sospensione è stata trasferita nel mezzo di coltura delle cellule. A 6 ore dalla trasfezione, le cellule sono state sottoposte a 2 lavaggi con terreno DMEM completo e, infine, incubate con 7 ml di terreno DMEM completo. La raccolta delle cellule trasfettate e dei relativi surnatanti è stata effettuata 24 ore dopo la trasfezione.

5.2.13. Preparazione dei lisati cellulari per l'analisi mediante Western Blotting

Le cellule 293T sottoposte a trasfezione sono state staccate dal piatto di coltura con tripsina e lavate dal terreno di coltura per 3 volte con tampone fosfato (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) freddo, mediante centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti. In seguito, le cellule sono state lisate tramite risospensione in 350 µl di soluzione di lisi [RIPA 1X con l'aggiunta della miscela di inibitori delle proteasi *Complete* 1X (Estratto di pancreas, Pronasi, Termolisina, Chimotripsina, Tripsina, Papaina) (Roche/Boehringer)] ed incubate per 30 minuti a 4°C. In questo modo è stata favorita la lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine, bloccando l'attività delle proteasi intracellulari che, una volta rilasciate, avrebbero potuto degradare le proteine di interesse. I campioni sono stati successivamente centrifugati a 13000 rpm per 30 minuti a 4°C, al fine di separare le proteine in soluzione dai detriti cellulari. Il surnatante ottenuto è stato sottoposto a corsa elettroforetica denaturante in gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) (Paragrafo 5.2.18.).

5.2.14. Saggio di quantificazione degli estratti cellulari

La quantità totale di proteine contenute negli estratti cellulari è stata determinata utilizzando il kit commerciale *Micro BCA Protein Assay* (Pierce), basato su un saggio colorimetrico che permette la determinazione della concentrazione proteica mediante la costruzione di una curva standard e quantificazione allo spettrofotometro. Tale saggio sfrutta la proprietà dell'acido bicinconinico (BCA), fornito sotto forma di sale sodico, di reagire con elevata sensibilità con ioni rame (Cu¹⁺) per formare un prodotto di reazione di colore viola, idrosolubile e caratterizzato da un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 562 nm. Gli ioni rame (Cu¹⁺) sono resi disponibili in ambiente alcalino in seguito all'interazione tra proteine e ioni Cu²⁺ (reazione del biureto). Poiché il prodotto di reazione è direttamente proporzionale alla quantità totale di proteine presenti nei reagenti, è possibile una quantificazione proteica mediante analisi spettrofotometrica.

Per ogni campione, sono state prelevate dagli estratti cellulari aliquote di 3 μ l, aliquotate in piastre da 96 pozzetti (Falcon), diluite fino ad un volume finale di 100 μ l in acqua milliQ ed incubate con 100 μ l della miscela dei reagenti del kit. Dopo un'incubazione di 2 ore a 37°C, il prodotto di reazione è stato quantificato allo spettrofotometro. La quantità totale di proteine presenti nei campioni è stata estrapolata per confronto con una curva di taratura ottenuta con quantità note di sieralbumina bovina. Ogni campione è stato analizzato in triplicato.

5.2.15. Produzione di particelle lentivirali

L'espressione della sola poliproteina Pr55Gag di HIV-1 è sufficiente per guidare l'assemblaggio ed il rilascio di particelle simil-virali (VLPs) non infettive e immature (Gottlinger *et al.*, 1991, Strack *et al.*, 2003; Dussupt *et al.*, 2011). Nel presente lavoro, attraverso la trasfezione di cellule della linea 293T sono state ottenute VLPs o virioni modificati mediante l'utilizzo del plasmide pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻ Δ env-CAT come tale o in cui è stata inserita la regione del gene *gag* derivata dal paziente.

La raccolta del mezzo di coltura, nel quale vengono rilasciati i virioni o le VLPs, è stata effettuata a 16, 24 o 48 ore dalla trasfezione. Il terreno è stato raccolto in tubi da centrifuga (Falcon) da 15 ml e sottoposto a centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti a 4°C, al fine di sedimentare i detriti cellulari in esso presenti. Il surnatante è stato successivamente filtrato (0.45 μ m, Millipore), opportunamente aliquotato e conservato a -80°C.

5.2.16. Saggio di attività retrotrascrittasi (RT assay)

La titolazione delle particelle virali prodotte dalla trasfezione di cellule 293T è stata eseguita attraverso il saggio dell'attività retrotrascrittasi. Questa tecnica consente di determinare l'attività DNA polimerasica RNA-dipendente della trascrittasi inversa virale, come incorporazione di ³H-dTTP (deossitimidina trifosfato marcata radioattivamente con atomi di trizio) su di uno stampo sintetico di poliA in presenza di un innesco di oligo-dT. Due aliquote da 500 μ l di ciascuna sospensione virale sono state centrifugate a 14000 rpm per 2 ore a 4°C. Le

particelle virali precipitate sono state risospese in 10 µl di tampone contenente Tris-HCl 50 mM pH 7.5, DTT (ditiotreitolo) 1 mM, glicerolo 20% (v/v), KCl 250 mM e Triton X-100 0.25% (v/v). Per la lisi i virioni sono stati sottoposti a tre cicli di gelo-scongelo. Alla sospensione virale sono stati aggiunti 40 µl di miscela di reazione contenente: poliA 100 µg/ml, oligo-dT 10 µg/ml, 2 µCi di ³H-dTTP (43 Ci/mmol), Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 7.5 mM, Triton X-100 0.05% (v/v) e DTT 5 mM. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C, il prodotto di reazione è stato trasferito su filtri DE81 (Whatman). I filtri sono stati sottoposti a 3 lavaggi da 10 minuti con SSC 2X (NaCl 3 M, sodio citrato 0.3 M, pH 7.2) e 2 volte con etanolo 96% (v/v) per 10 secondi. I filtri sono stati quindi asciugati ed analizzati al beta-counter (Rackbeta 1214 Wallac).

5.2.17. Purificazione delle VLPs mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio (*virion pelleting*)

Le particelle lentivirali e le VLPs, ottenute come descritto nel Paragrafo 5.2.15, sono state purificate dal mezzo di coltura mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio. La tecnica ha previsto la stratificazione dell'intero volume di surnatante contenente le VLPs su una soluzione di 4 ml di saccarosio al 20% (p/v) in tubi da centrifuga (*Polyallomer Centrifuge Tubes* 14 x 89 mm, Beckman), che sono stati successivamente sottoposti a centrifugazione a 27000 rpm per 2 ore a 4°C. Dopo l'eliminazione del terreno di coltura e dello strato di saccarosio mediante aspirazione, il sedimento virale è stato risospeso in 35µl di RIPA 1X (NaCl 150 mM, IGEPAL CA-630 1% (v/v) (Sigma), acido deossicolico 0.5% (p/v), SDS 1% (p/v) (Bio-Rad), Tris-HCl 50 mM pH 8.0) e sottoposto a SDS-PAGE (Paragrafo 5.2.18.).

5.2.18. Elettroforesi denaturante di proteine (SDS-PAGE)

Le proteine contenute nelle VLPs, nei virioni e nei lisati cellulari sono state analizzate mediante corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti e successivo Western Blotting. I campioni sono stati diluiti nel tampone di caricamento Laemmli *Buffer 2X* [Tris-HCl 100 mM pH 6.8, SDS 4% (p/v), glicerolo 20% (p/v), blu di bromofenolo 0.2% (p/v), DTT 200 mM, in presenza o meno di β -mercaptoetanololo 5%] e bolliti a 100°C per 5 minuti, prima di essere caricati in gel. Al fine di verificare la corretta dimensione delle proteine di interesse, è stato impiegato il marcatore di peso molecolare *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas; proteine 170/130/95/72/55/43/34/26/17 kDa).

La corsa elettroforetica dei campioni è avvenuta in gel di poliacrilamide delle dimensioni di 200 x 200 mm e dello spessore di 1 mm o in minigel delle dimensioni di 60 x 80 mm e dello spessore di 1.5 mm, preparati come da ricetta:

- gel di concentrazione (*stacking gel*) al 4.5% (p/v) di acrilammide, costituito da 4 ml di Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 2.4 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v), 160 μ l di SDS 10% (p/v) (Bio-Rad), 20 μ l di N,N,N,N',N'-tetrametiletilenediammina, TEMED (Bio-Rad), 80 μ l di ammonio persolfato (APS) 10% (p/v) (Bio-Rad) e portato al volume finale di 16 ml con acqua deionizzata;
- gel di separazione (*separating gel*) al 10% (p/v) di acrilammide, costituito da 12.5 ml di Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 16.6 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v) (Bio-Rad), 500 μ l di SDS 10% (p/v) (Bio-Rad), 40 μ l di TEMED (Bio-Rad), 200 μ l di APS 10% (p/v) (Bio-Rad) e portato al volume finale di 50 ml con acqua deionizzata.

La migrazione elettroforetica è stata effettuata con un'intensità di corrente costante (80 V per circa 12 ore, nel caso dei gel delle dimensioni di 200 x 200 mm; 90V per 2 ore e 30 minuti, nel caso di minigel), in presenza di un tampone di corsa [Tris 0.25 M (Bio-Rad), glicina 1.9 M (Bio-Rad), SDS 0.1% (p/v) (Bio-Rad) pH 9.2].

5.2.19. Western Blotting

Le proteine separate in gel di poliacrilamide, come descritto al paragrafo precedente, sono state trasferite elettricamente su una membrana di nitrocellulosa (*PROTRAN® pure nitrocellulose transfer and immobilization membrane*, Whatman - PerkinElmer), utilizzando l'apparato per il trasferimento *Trans-Blot Cell* (Bio-Rad). Prima del trasferimento, la membrana ed il gel sono stati equilibrati per 30 minuti nell'appropriato tampone di trasferimento [Tris 0,25 M (Bio-Rad), glicina 1.9 M (Bio-Rad), metanolo 20% (v/v)]. Il trasferimento è stato condotto per 2 ore a temperatura ambiente, al voltaggio costante di 50 V. Successivamente, allo scopo di saturare i siti di legame aspecifici, la membrana è stata incubata per un tempo minimo di 45 minuti in agitazione con una soluzione bloccante [latte scremato in polvere al 5% (p/v) (Bio-Rad) in tampone fosfato PBS addizionato al 0.1% (v/v) di Tween 20 (Sigma)]. In seguito la membrana è stata immersa in una soluzione contenente l'anticorpo primario specifico per le proteine oggetto di analisi [anticorpo monoclonale anti-p24 GAG (HIV-1) (*rabbit*, ABI Advanced Biotechnologies)] ed incubata a 4°C per 16 ore circa in agitazione. Dopo trattamento con l'anticorpo primario, la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno in PBS addizionato dello 0.1% (v/v) di Tween 20 e, in seguito, incubata per 1 ora con l'anticorpo secondario [immunoglobuline di pecora anti-*rabbit* (GE Healthcare)] coniugate all'enzima perossidasi di rafano (HRP, *horseradish peroxidase*). Dopo 3 ulteriori lavaggi, analoghi ai precedenti, la membrana è stata lavata per un'ultima volta solamente in PBS. Successivamente si è proceduto ad un'incubazione per 1 minuto con una soluzione contenente il substrato per la reazione chemiluminescente della perossidasi (*ECL Plus Western Blotting Detection system*, Amersham Bioscience) con cui sono state impressionate le lastre fotografiche (*Biomax light film*, Kodak) sovrapponendole alla membrana. Le lastre sono state esposte alla membrana per un tempo variabile tra 30 secondi e 5 minuti e successivamente sviluppate mediante l'impiego dell'apparato *Hyper processor* (Amersham Biosciences).

5.2.20. Allestimento della coltura cellulare primaria di macrofagi

Cellule umane monocito-macrofagiche sono state isolate da sangue periferico di donatore sano, diluito 1:2 in PBS (*Phosphate Buffered Saline*, NaCl 150 mM, tampone sodio fosfato 10 mM, pH 7.2), mediante centrifugazione in gradiente di Ficoll-Paque Plus (Amershan Biosciences) a 1700 rpm per 45 minuti. Il Ficoll, copolimero di saccarosio ed epicloridina a bassa densità, consente la sedimentazione di granulociti ed eritrociti e l'isolamento delle cellule bianche del sangue che formano un anello all'interfaccia tra Ficoll e solventi. Dopo la separazione, la frazione cellulare è stata sottoposta a 10 lavaggi e risospesa in terreno di crescita RPMI 1640 supplementato al 10% di FBS precedentemente inattivato al calore. Le cellule sono state quindi seminate in fiasche T75 (Corning) ed incubate per tutta la notte a 37°C con il 5% di CO₂ per consentire l'adesione delle cellule monocitiche. Il giorno dopo, le cellule non aderenti sono state rimosse mediante aspirazione ed il monostrato cellulare è stato lavato abbondantemente in PBS. Le cellule monocito-macrofagiche sono state staccate meccanicamente dalla piastra di coltura con *cell scraper*, contate e seminate in fiasche T25 (Falcon) alla densità di 4x10⁶ cellule per fiasca. Il differenziamento a macrofagi è stato indotto aggiungendo 500 U/ml di GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*, R&D Systems) al terreno di crescita RPMI 1640 con il 10% di FBS.

La purezza della popolazione di macrofagi primari è stata determinata al citofluorimetro valutando l'espressione del recettore di superficie CD14, normalmente utilizzato come marcatore di monociti e macrofagi.

5.2.21. Analisi citofluorimetrica

Il citofluorimetro consente di effettuare un'analisi multiparametrica della popolazione cellulare in esame. Nel citogramma vengono rappresentate le caratteristiche fisiche e morfologiche di ciascuna cellula: il *Forward Scatter* è funzione del diametro cellulare, mentre il *Side Scatter* è proporzionale alla granulosità interna ed al rapporto nucleo/citoplasma della cellula. Lo strumento consente di selezionare elettronicamente una sottopopolazione di interesse

(*gating*) sulla quale eseguire l'analisi dei segnali di fluorescenza. Nell'istogramma quindi viene rappresentata l'intensità di fluorescenza in funzione del numero di cellule emittenti della popolazione cellulare selezionata.

Le coltura primaria di macrofagi è stata analizzata al citofluorimetro (BD FACSCalibur) per l'espressione del marcatore di superficie CD14.

Le cellule sono state raccolte e, dopo due successivi lavaggi in PBS freddo, sono state incubate con anticorpo primario monoclonale umano anti-CD14 (1:100, ACRIS Antibodies) per un'ora a 4°C. Dopo aver eseguito 3 lavaggi in PBS freddo per rimuovere gli eventuali residui di anticorpo primario, le cellule sono state incubate con anticorpo secondario FITC (1:200, DAKO) per un'ora a 4°C. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate con PBS freddo, risospese in 1 ml di PBS e analizzate al citofluorimetro (FacsCalibur, Becton Dickinson) per l'espressione di CD14.

5.2.22. Saggio di infettività delle particelle (*CAT assay*)

L'infettività delle particelle virali è stata valutata in termini di attività CAT. In particolare, 10^6 cellule umane monocito-macrofagiche (ottenute con il procedimento illustrato nel paragrafo 5.2.19.) seminate in piastre da sei pozzetti sono state coltivate in RPMI al 10% di FBS contenente GM-CSF per una settimana. Le cellule sono state trasdotte con 30,000 cpm di unità di attività retrotrascrittasi di ciascuna delle particelle HIV-1 ricombinanti precedentemente prodotte (Paragrafo 5.2.14.), esprimenti il gene *reporter* CAT, in un volume finale di 2 ml. A 72 ore dalla trasduzione, i macrofagi sono stati staccati con *cell scraper*, raccolti, lavati due volte con PBS e lisati in 150 µl di 250 mM Tris-HCl pH 7.5 mediante tre cicli di gelo-scongelo. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 13,000 rpm a 4°C il contenuto proteico dei lisati cellulari è stato determinato come descritto al Paragrafo 5.2.14. Quantità equivalenti di lisato proteico (da 1 a 40 mg) sono quindi state sottoposte a saggio CAT.

Il saggio sfrutta le capacità acetilanti dell'enzima batterico cloramfenicolo acetiltransferasi (CAT), un enzima normalmente assente nelle cellule eucariotiche, in grado di trasferire su uno o entrambi i gruppi idrossilici del cloramfenicolo un gruppo acetile, utilizzando come substrato l'acetil coenzima A (AcetilCoA). Il

gene codificante tale enzima è presente nei plasmidi utilizzati per ottenere HIV-1 ricombinante. Un'equivalente quantità di proteine è stata quindi incubata a 37°C per 1 ora, con 3.125 µCi/ml di ¹⁴C-cloramfenicolo (attività specifica 57 mCi/mole) e 250 µg/ml di AcetilCoA. Il volume finale della reazione è stato portato a 100 µl con Tris-HCl 250 mM pH 7.5. Al termine del tempo di incubazione, la reazione è stata bloccata per aggiunta di Etil Acetato. La fase organica superiore (450 µl) è stata concentrata al liofilizzatore e risospesa in 15 µl di Etil Acetato. Questi venivano caricati su carta utilizzata per cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography*, TLC), e le diverse forme di cloramfenicolo acetilato sono state separate mediante migrazione in una miscela di cloroformio 95% (v/v) e metanolo 5% (v/v). La separazione è stata quindi rilevata mediante esposizione autoradiografica per 12 ore (lastre Kodak BioMax). Tale procedura ha permesso di visualizzare sulla lastra quattro macchie: la prima più vicina al punto di caricamento, che corrisponde alla forma non acetilata del cloramfenicolo, la seconda e la terza che seguono, corrispondono alle due forme di mono-acetilazione e l'ultima, in ordine di distanza, che ha migrato più velocemente che corrisponde alla forma diacetilata. Quest'ultima è visibile solamente ad elevate concentrazioni dell'enzima. La valutazione quantitativa è stata ottenuta mediante taglio della carta TLC a livello delle macchie corrispondenti e quantificazione delle stesse allo scintillatore (Rackbeta 1214, Wallac); la percentuale di conversione è stata calcolata a partire dai valori in cpm secondo la formula:

$$\% \text{ di conversione} = \frac{\text{(forma mono + diacetilata)}}{\text{(forma non acetilata + mono-acetilata + di-acetilata)}}$$

Calcolata in questo modo, la percentuale di conversione ha andamento lineare per valori non superiori al 50%. Nei casi in cui i valori fossero superiori a tale soglia, il saggio è stato ripetuto con quantità inferiori di estratto cellulare.

Le operazioni di trasfezione, infezione e raccolta delle cellule sono state effettuate nel laboratorio di biosicurezza BL3.

6. RISULTATI

6.1. Premessa

Nel mondo sono più di 35 milioni le persone infette da HIV-1 ed ogni anno circa 3 milioni di persone contraggono l'infezione. Ad oggi l'unico sistema che permette di ridurre la trasmissione del virus e di controllare la progressione della malattia è la terapia antiretrovirale. Il maggior problema legato all'utilizzo dei farmaci, soprattutto in condizioni di aderenza subottimali, rimane la comparsa e la trasmissione di varianti virali resistenti.

Nella pratica clinica i sistemi utilizzati per diagnosticare la presenza di farmacoresistenze in pazienti HIV-1 positivi naïve (non sottoposti a trattamento) o in terapia antiretrovirale prevedono l'amplificazione ed il sequenziamento della regione 5' del gene *pol*, compresa tra la sequenza codificante la proteasi (PR) e il dominio catalitico, nello specifico i primi 324 amminoacidi, dell'enzima retrotrascrittasi (RT). Le informazioni ottenute applicando questa analisi possono essere in accordo con il quadro clinico generale osservato nel paziente e quindi essere considerate esaustive, ma spesso i meccanismi che sottendono a tali processi sono complessi e coinvolgono ulteriori regioni del genoma virale. Recentemente numerosi studi di resistenza ai farmaci eseguiti *in vitro* hanno focalizzato l'attenzione sul possibile coinvolgimento della regione genomica *gag* di HIV-1 nel determinare l'insorgenza di resistenze ai farmaci antiretrovirali (Gatanaga *et al.*, 2002; Callebaut *et al.*, 2007; Aoki *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2010). Parallelamente, *in vivo* sono state identificate sostituzioni amminoacidiche nei siti di taglio di Pr55Gag che correlano in modo statisticamente significativo con la presenza di specifiche mutazioni primarie in PR (Cote *et al.*, 2001; Kolli *et al.*, 2009; Verheyen *et al.*, 2009; Verheyen *et al.*, 2010). Tali mutazioni sembrano inoltre predisporre pazienti naïve al fallimento di regimi terapeutici contenenti inibitori di PR (*Protease Inhibitors*, PIs) (Larrouy *et al.*, 2010). Anche regioni non comprese nei *cleavage sites* sembrano essere potenzialmente coinvolte nei meccanismi di resistenza o nel recupero della capacità replicativa del virus mutante (Dam *et al.*, 2009; Parry *et al.*, 2009; Parry *et al.*, 2011; Shibata *et al.*,

2011). A tutt'oggi sono tuttavia limitati gli studi atti ad identificare lo specifico contributo di ciascuna posizione amminoacidica della proteina Pr55Gag nello sviluppo delle resistenze e definire il loro impatto sulle diverse fasi del ciclo replicativo del virus. A tale proposito, in questo lavoro di tesi ci si è proposti di analizzare il contributo della regione genomica *gag* nei meccanismi di resistenza. Grazie alla collaborazione con il Prof. Parisi (Università degli Studi di Padova), abbiamo avuto accesso ai campioni clinici di pazienti HIV-1 positivi che fanno parte della coorte Veneta CAVeAT, a cui afferiscono cinque Unità di Malattie Infettive situate in Veneto. Dopo aver messo a punto le condizioni di amplificazione e sequenziamento dei geni *gag* di isolati virali ottenuti da campioni clinici, sono stati selezionati casi di pazienti in cui la terapia contenente PIs e RTIs era fallita. Il sistema sperimentale scelto per analizzare l'effetto delle mutazioni osservate *in vivo* in Pr55Gag si basa sull'utilizzo di un provirus caratterizzato da una delezione a carico del gene *env*, che lo rende capace di un singolo ciclo di replicazione, e da un gene reporter, che permette di saggiare l'infettività dei virioni. Sulla base del profilo di resistenza e delle caratteristiche di sequenza ricavate dall'analisi del gene *gag*, è stato scelto di analizzare l'effetto della regione N-terminale di Pr55Gag derivata da un solo paziente (304), in termini di: (i) rilascio, (ii) processamento ed (iii) infettività.

6.2. Analisi genotipica del gene *gag* in pazienti HIV-1 positivi

Al fine di studiare il possibile contributo della regione *gag* sull'insorgenza delle farmaco resistenze, in primo luogo sono state messe a punto le condizioni sperimentali per analizzare la sequenza dei geni *gag* di pazienti HIV-1 positivi sottoposti o meno a trattamento farmacologico. Sulla base di dati presenti in letteratura relativi alle regioni conservate e considerando la prevalenza dei sottotipi circolanti in Italia (figura 6.1.), sono state disegnate quattro coppie di *primers* degenerati, di cui la sequenza è riportata nella Tabella 5.2. di Materiali e Metodi. Le posizioni degeneri inserite permettono il riconoscimento e l'amplificazione di sequenze *gag* appartenenti ad isolati virali non solo di sottotipo B, forma genetica prevalente in Italia, ma anche di altri e nuovi sottotipi oltre alle forme ricombinanti circolanti.

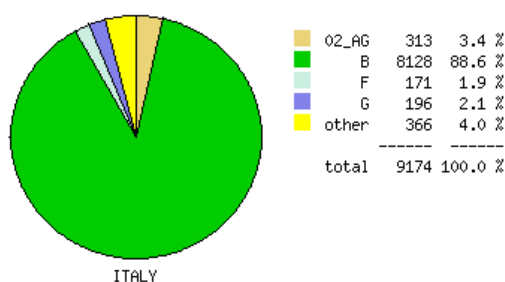


Figura 6.1. Prevalenza dei sottotipi circolanti in Italia (dati aggiornati al 2010).

A partire da RNA virale, estratto dal plasma dei pazienti, ma con caratteristiche non note in termini di sottotipo o carica virale sono state messe a punto le condizioni di amplificazione, riportate in dettaglio nella sezione Materiali e Metodi (Paragrafo 5.2.5.). Brevemente, in una prima fase l'RNA virale è stato sottoposto ad un'unica reazione di retrotrascrizione ed amplificazione utilizzando le coppie di oligonucleotidi: G1 e G4 o G5 e G8. Al fine di aumentare la resa e la specificità della reazione, i prodotti ottenuti sono stati nuovamente amplificati rispettivamente con i *primers* interni G2 e G3 o G6 e G7. Gli amplificati ottenuti, di dimensioni pari a 1204 pb e 942 pb, comprendevano rispettivamente la regione 5' e la regione 3' di *gag*, secondo lo schema riportato in figura 5.1. Gli amplificati così ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento. La sequenza nucleotidica

dell'intero gene è stata successivamente ricostruita sovrapponendo gli elettroferogrammi relativi a quattro reazioni di sequenziamento separate e tradotta utilizzando il *software* Transeq-EBI (disponibile al sito http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/). La sequenza amminoacidica di Gag derivata dal paziente è stata confrontata con quella del virus di riferimento HxBc2 di sottotipo B (NCBI *Reference Sequence*: NP_057850.1). Questo protocollo è applicabile potenzialmente ad ogni tipo di campione di RNA estratto da plasma di pazienti HIV-1 positivi.

6.3. Profili di resistenza di PR e RT in campioni HIV-1 positivi di pazienti in fallimento terapeutico

In collaborazione con il Professor Parisi, sono stati selezionati un certo numero di casi clinici di pazienti HIV-1 positivi caratterizzati dal fallimento di regimi terapeutici contenenti PIs e RTIs, successivamente indicati con i numeri 304, 379, 298, 383 e 709. Per ciascuno di essi erano a disposizione le informazioni di sequenza ottenute con i test genotipici eseguiti di *routine* per la diagnostica di resistenze nella Unità Operativa Complessa di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova (Tabella 6.1.). Per la predizione di mutazioni nel gene *pol* in grado di conferire resistenza ai farmaci antiretrovirali, la parte di sequenza compresa tra PR e dominio catalitico di RT è stata sottomessa al *Genotypic Resistance Interpretation Algorithm (HIVdb Program, HIV Drug Resistance Database, Stanford University)*. Questo sistema bioinformatico è in grado di restituire un'analisi dettagliata del contributo di ciascuna sostituzione nella resistenza ai farmaci antiretrovirali di classe NRTIs, NNRTIs e PIs in uso corrente, distinguendo tra polimorfismi, mutazioni primarie e secondarie.

I dati a disposizione sono riportati in Tabella 6.1. Come si può osservare, l'analisi relativa a ciascun paziente selezionato ha evidenziato la presenza di uno specifico *pattern* di mutazioni che conferisce resistenza a più farmaci antiretrovirali. Infatti, un'unica mutazione, come ad esempio L90M nella proteasi del paziente 304, selezionata dall'uso di uno specifico inibitore, può portare alla perdita di sensibilità nei confronti di molti altri farmaci della stessa classe. Gli isolati virali dei pazienti 298, 379 e 383 sono risultati potenzialmente resistenti a tutti i farmaci antiretrovirali inclusi nell'analisi, nonostante il diverso profilo mutazionale in PR e RT. Oltre a mutazioni con un ruolo riconosciuto nella resistenza ai farmaci antiretrovirali, sono presenti altre sostituzioni che al momento vengono riconosciute come polimorfismi.

Codice Paziente	Mutazioni in PR	Mutazioni in RT	Resistenze predette
304	Primarie: L90M Secondarie: L10I, V32GV, A71T Altre: N37S, R41K, L63P, H69N, V77I	NRTIs: nessuna NNRTIs: nessuna Altre: E6D, V35M, Y127DY, I135IV, I178IR, F214L	PIs: IDV/r, FPV/r, ATV/r, NFV, SQV/r NRTIs: nessuna NNRTIs: nessuna
379	Primarie: M46IM, I47IV, I54M, L76LV, I84V, L90M Secondarie: L10FL, V11IV, A71V, G73S, L89V Altre: I13V, I15V, G16A, K20V, E34D, E35N, M36I, R41KN, R57KR, D60E, I62IV, L63P, I72L	NRTIs M41L, D67N, T69D, L74I, M184V, L210W, T215Y, K219HQ NNRTIs: A98G, V108I, E138DEHQ, V179FV, Y181CFGV Altre: V35I, T39AT, V60I, V118I, K122E, I135L, I142IT, S162NS, G196E, I202V, D218E, L228H, Q242H, V261EV, A272AP	PIs: tutti NRTIs: tutti NNRTIs: tutti
298	Primarie: V32I, M46I, I47V, I54M, I84V Secondarie: L10I, Q58E, A71V Altre: E35i, I62IV, L63PS, I85V	NRTIs: M41L, D67N, M184MV, L210W, T215CDGY, K219EK NNRTIs: K103KN, Y181C Altre: E44D, V60I, V118I, I135T, V261EV, A272AP	PIs: tutti NRTIs: tutti NNRTIs: tutti
383	Primarie: V32I, M46L, I54L, I84V, L90M Secondarie: L10F, L33F, Q58E, A71V, L89V Altre: I13V, I15V, L19V, K20T, E35N, M36I, D60E, Q61H, I62V, L63P, I66L, C67F, H69Q, K70E, I72T, G73N, I93M	NRTIs: M41L, L74V, M184V, L210W, T215Y, K219N NNRTIs: L100I, K103N Altre: K20R, T39A, S68G, K122E, T139M, Q174K, I178L, T200A, H208Y, R211K, V245E, V261EV, A272AP	PIs: tutti NRTIs: tutti NNRTIs: tutti
709	Primarie: V32I, M46FILM, N88S Secondarie: L10V, L33F, A71IT Altre: I13V, K14R, K43EK, L63P	NRTIs: M41L, M184V, T215Y NNRTIs: K103KN Altre: I135T, I142IV, I178IM, V179IV, T200A, Q207E, V261EV	PIs: tutti tranne SQV/r eTPV/r NRTIs: tutti NNRTIs: EFV e NVP

Tabella 6.1. Genotipi dei pazienti HIV-1 positivi selezionati, ottenuti dall'analisi del gene *pol*. PIs considerati nell'analisi: ATV/r, DRV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r, TPV/r. RTIs inclusi nell'analisi: NRTIs: 3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC, TDF; NNRTIs: EFV, ETR, NVP, RPV.

B.

Pt379 MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKQYKCLKHIVWASRELDRLFALNPGLLETSEGCRQI 60
HxBc2 MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKCLKHIVWASRELEERFAVNPGLLETSEGCRQI 60
*****:*****:*****:*****:*****

Pt379 XRQLQPSLQGTGTEEXKSLYNTVATLYCVHQRIEVKDTKEALDKIEEEQNKSKQKEQAAAA 120
HxBc2 LGQLQPSLQGTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEEQNKSKKKAQAAAA 120
*****:***:*****:*****:*****:***

Pt379 NTGSGSQISQNFPIVQNLQGMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALAEAGAT 180
HxBc2 DTGHSNQVSQNYPIVQNIQGMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIPMFSALSEGAT 180
:***:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Pt379 PQDLNMLNTVGGHQAMQMLKETINEEAAEWDRLHPVHAGPVAPGQMPREPRGSDIAGST 240
HxBc2 PQDLNMLNTVGGHQAMQMLKETINEEAAEWDRVHPVHAGPIAPGQMPREPRGSDIAGT 240
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Pt379 STLQEQIGWMTSNPAIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSVPSILDIRQGPKEPFRDYVDRF 300
HxBc2 STLQEQIGWMTNPPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSPTSILDIRQGPKEPFRDYVDRF 300
*****:***:*****:*****:*****:*****:*****

Pt379 YKTLRAEQASQDVKNWMTETLLVQNSNPDCCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKA 360
HxBc2 YKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANPDCCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGGPGHKA 360
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Pt379 RILAEAMSQAT-SAATMMQRGNFRNQKIVKCFNCGKEGHVAKNCRAPRKKGCWKCGKEG 419
HxBc2 RVLAEAMSQVTSATIMMQRGNFRNQKIVKCFNCGKEGHTARNCRAPRKKGCWKCGKEG 420
*:*****:***:*****:*****:*****:*****:*****

Pt379 HQMKDCNDRQVNFGLGKIWPSRKERPGNFLQSSLEPTAPPEESVR--EQTTTPSQKQEQT 477
HxBc2 HQMKDCT-ERQANFLGKIWPSYKGRPGNFLQSRPEPTAPPEESFRSGVETTTTPQKQEPI 479
*****:***:***** * ***** *****:***:*****

Pt379 DKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ 499
HxBc2 DKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ 500

E.

```

Pt709      MGARASVLSGGELDRWXKIRLRPGGKKQYKPKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCKQI 60
HxBc2      MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKYKPKHIVWASRELERFAVNPGLLETSEGCRQI 60
*****
Pt709      LGQLQPSLQGTGSEELRSLYNTIATLYCVHQRIDVKDTKEALDKIEEQNKCKKKAQQAAA 120
HxBc2      LGQLQPSLQGTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEALDKIEEQNKSKKKAQQAAA 120
*****
Pt709      AQQTAAGTGNSQVSNYPYIYQNLQGGQMVHQALS PRTLNAWVKVVEEKAFSPEIIPMFSA 180
HxBc2      D-----TGHSNQVSNYPYIYQNIQGGQMVHQAIS PRTLNAWVKVVEEKAFSPEIIPMFA 174
*****
Pt709      LSEGATPQDLNMLNTVGGHQAAQMQLKETINEEAAEWDRLHPVQAGPVAPGQMRPRGS 240
HxBc2      LSEGATPQDLNMLNTVGGHQAAQMQLKETINEEAAEWDRLHPVHAGPIAPGQMRPRGS 234
*****
Pt709      DIAGTTSTLQEQIAWMTNPAIPVGEIYKRWIIMGLNKIVRMYS PVSILDIRQGPKEPFR 300
HxBc2      DIAGTTSTLQEQIGWMTNPPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYS PVSILDIRQGPKEPFR 294
*****
Pt709      DYVDRFYKTLRAEQASQDVKNWMTETLLVQNSNPDKTILKALGPGASLEEMMTACQGVG 360
HxBc2      DYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQANPDKTILKALGPAATLEEMMTACQGVG 354
*****
Pt709      GPSHKARVLAEAMSQVNSNSPAIMMQRGNFRNQRKPKVCFNCGKEGHIARNCRAPRKKGC 420
HxBc2      GPGHKARVLAEAMSQVT-NSATIMMQRGNFRNQRKPKVCFNCGKEGHTARNCRAPRKKGC 413
*****
Pt709      WKCGKEGHXMKDCTERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPSAPPAESFGFGEETTTTP 480
HxBc2      WKCGKEGHQMKDCTERQANFLGKIWPSYKGRPGNFLQSRPEPTAPPEESFRSGVETTTTP 473
*****
Pt709      QKQEPDKELYPLASLRSFLGNDPSSQ 508
HxBc2      QKQEPIDKELYPLTSLRSFLGNDPSSQ 500
*****

```

Figura 6.2. Allineamento della sequenza amminoacidica di Pr55Gag ottenuta dall'analisi dei rispettivi geni di ciascuno dei pazienti selezionati con la sequenza di riferimento HxBc2 (programma bioinformatico ClustalW2): A. allineamento Pr55Gag del paziente 304; B. allineamento Pr55Gag del paziente 379; C. allineamento Pr55Gag del paziente 298; D. allineamento Pr55Gag del paziente 383; E. allineamento Pr55Gag del paziente 709.

Come riportato in figura 6.2., per ciascun campione analizzato è stata osservata la presenza di numerose sostituzioni amminoacidiche a carico della proteina Pr55Gag rispetto al ceppo di riferimento. Ad una prima analisi è risultato difficile stabilire la significatività di ciascuna sostituzione, in quanto sono limitati gli studi inerenti la variabilità naturale intrinseca di Pr55Gag e dei suoi siti di taglio (Fun *et al.*, 2012).

Prendendo in considerazione i siti riconosciuti dalla proteasi nei campioni in esame, riportati in figura 6.3., il maggior numero di sostituzioni amminoacidiche si osserva a livello del sito p2/NC (figura 6.3.), confermando i dati riportati in letteratura che lo indicano come il più variabile (Larrouy *et al.*, 2010). Essendo questo sito più frequentemente sottoposto a variazioni di sequenza, è ragionevole che sia più soggetto alla pressione selettiva esercitata dall'esposizione a PIs. Solo tre delle sostituzioni da noi evidenziate sono però state associate al trattamento con PIs *in vivo* ed in particolare, S373P, osservata nei pazienti 304 e 383, A374P, presente nel 709, e I376V, evidenziata nel 304 (Cote *et al.*, 2001; Verheyen *et al.*, 2010; Lambert-Niclot *et al.*, 2012).

Anche la mutazione Y132F nel sito di taglio MA/CA, che compare in tre dei cinque pazienti (379, 298 e 383), è stata correlata *in vivo* all'esposizione a PIs (Larrouy *et al.*, 2010).

SITI DI TAGLIO DELLA PROTEASI					
	MA/CA	CA/p2	p2/NC	NC/p1	p1/p6
	VSQNY/PIVQN	KARVL/AEAMA	SATIM/MQRGN	ERQAN/FLGKI	RPGNF/LQSRP
Pt304	-----/-----	-----/-----	P--V/--K--	-----/-----	-----/X-X--
Pt379	I---F/-----	---I-/-----	--AT-/-----	D--V-/-----	-----/---SL
Pt298	---F/-----	-----/-----	-T---/--K--	-----/--RL	-----/---A
Pt383	I---F/-----	-----/-----	PN---/I----	---V-/-----	-----/A--SL
Pt709	-----/-----	-----/-----	-PA--/-----	-----/-----	-----/-----

Figura 6.3. Sequenze dei siti di taglio di Pr55Gag per la proteasi nei campioni clinici analizzati (posizioni amminoacidiche di MA/CA: 128-137; CA/p2: 359-368; p2/NC: 373-382; NC/p1: 428-437; p1/p6: 444-453) In verde: sostituzioni amminoacidiche associate all'esposizione a PIs osservate sia *in vivo* che *in vitro*; in rosso: mutazioni associate all'esposizione a PIs osservate *in vivo*; in blu: mutazioni associate a PIs osservate solo *in vitro*.

6.5. Sistema sperimentale per l'analisi del ruolo delle regioni N- e C-terminali della proteina Pr55Gag derivate da pazienti sul ciclo replicativo di HIV-1

Allo scopo di determinare il contributo della proteina Pr55Gag nello sviluppo di resistenze e la sua specifica funzione nel ciclo replicativo di virus mutanti, è stata utilizzata una versione modificata del sistema di *trans*-complementazione, già descritto in precedenza (Helseth *et al.*, 1990; Parolin *et al.*, 2003). In particolare, il provirus impiegato è in grado di compiere un singolo ciclo di replicazione, perché presenta una delezione di 580 pb nella regione del gene *env*, a livello della quale è stato introdotto il gene *reporter* CAT (Cloramfenicolo Acetil Transferasi). L'espressione del gene *reporter* si trova sotto il controllo trascrizionale della 5'LTR virale (pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT). Esso è in grado di esprimere sia le componenti strutturali sia enzimatiche dalla particella, avendo i geni *gag* e *pol* intatti. Inoltre questo vettore ricombinante contiene tutti i geni accessori del virus, fatta eccezione di *rev*. Rev è essenziale durante la replicazione per il trasporto dal nucleo al citoplasma dei lunghi trascritti virali contenenti la sequenza RRE e quindi deve essere fornita *in trans*. Sebbene la proteina Gag sia in grado da sola di dirigere la formazione di *Virus-Like Particles* (VLPs) (Campbell *et al.*, 1995), la delezione introdotta nel gene *env* rende necessario fornire *in trans* le glicoproteine dell'*envelope* per produrre particelle virali infettive. La possibilità di pseudotipizzare i virioni permette di ottenere particelle con diverso tropismo a seconda del plasmide utilizzato per la co-trasfezione. Sono infatti disponibili in laboratorio plasmidi esprimenti glicoproteine dell'*envelope* di HIV-1 con diverso tropismo, T-tropiche, Macrofago tropiche e dual-tropiche.

Lo schema del sistema di *trans* complementazione è riportato in figura 5.3 di Materiali e Metodi.

È stata quindi disegnata una strategia di clonaggio che permette di analizzare il contributo differenziale della regione ammino-terminale e/o carbossi-terminale di Gag in presenza o meno degli enzimi PR-RT mutati (figura 5.3.). Con questo sistema ciascun prodotto di amplificazione ottenuto da paziente può essere inserito direttamente nel vettore di espressione contenente il genoma provirale di HIV-1.

6.6. Analisi del ruolo della regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente sul ciclo replicativo del virus

6.6.1. Produzione di virioni HIV-1 ricombinanti che esprimono la regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente

Allo scopo di determinare le ricadute funzionali di mutazioni a carico del gene *gag* sulla replicazione di virus resistenti al trattamento farmacologico, è stato selezionato uno dei campioni clinici sopra descritti. In particolare, si è proceduto con il campione clinico numero 304, contraddistinto da un basso livello di complessità nel profilo di resistenza e da mutazioni in Pr55Gag, meno caratterizzate da un punto di vista biologico-funzionale. Nello specifico, il campione 304, presenta:

- (i) un'unica mutazione primaria in PR (L90M) e nessuna sostituzione che conferisce resistenza a carico di RT;
- (ii) l'assenza di sostituzioni amminoacidiche nei siti di taglio per la proteasi con ruolo riconosciuto nei meccanismi di resistenza;
- (iii) la presenza, non solo di mutazioni in tutti i domini del Pr55Gag, ma anche di inserzioni a carico dei domini MA e p6. In particolare, l'analisi della regione ha predetto la presenza di sostituzioni amminoacidiche lungo l'intera proteina Pr55Gag, per la maggior parte non associate a resistenza. Le inserzioni in posizione 114 e 129 a carico del dominio MA sono AQQ e ASX (dove X sta per P o Q), mentre in posizione 454 nel dominio p6 sono presenti nove amminoacidi aggiuntivi, la cui sequenza è PTAPQNRAE.

La regione 5' del gene *gag* amplificata dal paziente 304, che codifica i domini MA e parte di CA, è stata clonata nel vettore provirale pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT, mediante restrizione enzimatica e ligazione (descritte in dettaglio nel Paragrafo 5.2.11.2. della sezione Materiali e Metodi).

Il vettore così ottenuto, dopo sequenziamento, è stato utilizzato per la produzione delle particelle lentivirali. Nello specifico, cellule 293T sono state trasfettate con il vettore provirale esprime la proteina Pr55Gag ricombinante in presenza del plasmide esprime l'*envelope* di HIV-1, che permette l'espressione anche della

proteina Rev. È possibile ottenere particelle con diverso tropismo utilizzando plasmidi che esprimono le glicoproteine dell'*envelope* di HIV-1: HxBc2 (T-tropico adattato in laboratorio), ELI (T-tropico primario), ADA (macrofago-tropico), 89.6 (primario dual-tropico); e VSV-G (glicoproteina G del Virus della Stomatite Vescicolare). In quest ultimo caso, la proteina Rev deve essere fornita *in trans* utilizzando il plasmide pRev che la esprime. Parallelamente, sono state ottenute particelle lentivirali esprimenti la proteina Pr55Gag *wild type* con o senza *envelope*.

6.6.2. Attività retrotrascrittica dei virioni ricombinanti esprimenti la regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente

Inizialmente, l'efficienza di rilascio di particelle nel surnatante delle cellule utilizzate per la produzione di virioni ricombinanti è stata valutata mediante quantificazione dell'attività retrotrascrittica. A tal fine, cellule 293T sono state co-trasfettate con il plasmide pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT recante o meno la regione 5'gag derivata dal paziente ed i plasmidi esprimenti i diversi *envelope* e la proteina Rev. Dopo 48 ore dalla trasfezione, i surnatanti sono stati raccolti, opportunamente processati e saggiati per il contenuto di attività retrotrascrittica.

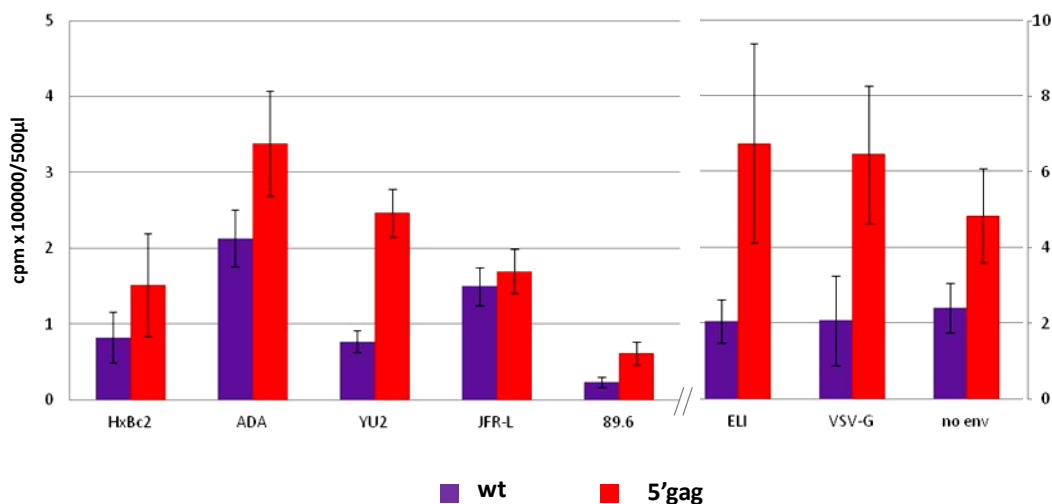


Figura 6.4. Attività retrotrascrittica associata ai virioni ricombinanti rilasciati nel surnatante delle cellule 293T co-trasfettate con pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT esprimente la regione N-terminale di Pr55Gag derivata dal paziente (5'gag, in rosso) o la proteina Pr55Gag *wild type* (wt, in viola), pRev e uno dei plasmidi pSVIIIenv, codificanti gli *envelope* HxBc2, ADA, YU2, JFR-L, 89.6 ed ELI di HIV-1, oppure con l'*envelope* eterologo VSV-G o senza *envelope* (no env). I valori riportati sono indicativi di almeno tre esperimenti indipendenti. Sono stati riportati il valore medio e la rispettiva deviazione standard.

Come riportato in figura 6.4., si osserva un aumento dell'attività retrotrascrittica nel surnatante delle cellule trasfettate con il DNA provirale che esprime la regione ammino-terminale mutata della proteina Pr55Gag che deriva dal paziente in analisi rispetto a quello in cui il gene *gag* non contiene mutazioni, indipendentemente dall'*envelope* impiegato.

6.6.3. Rilascio di particelle virali esprimenti la regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente

Una volta valutati gli effetti della regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente in termini di attività retrotrascrittivica, il rilascio è stato analizzato anche mediante SDS-PAGE e Western Blotting. Le cellule 293T sono quindi state trasfettate con il DNA provirale di HIV-1 (pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT-5'gag o pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT) ed i plasmidi esprimenti i diversi *envelope* e la proteina Rev. A distanza di 48 ore le cellule sono state raccolte, lisate e le proteine estratte. I sovranatanti, invece, sono stati purificati su cuscino di saccarosio e trattati con l'opportuno buffer di lisi. I campioni proteici così ottenuti, lisati cellulari e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting. L'impiego di un anticorpo diretto contro la proteina p24 di HIV, che riconosce in modo specifico questo epitopo, permette di visualizzare tutte le proteine che contengono la suddetta sequenza amminoacidica, in particolare la proteina p24 (CA) stessa, gli intermedi di processamento p41 (MA-CA) e p37 (CA-p1-NC-p2) ed il precursore Pr55Gag.

C.

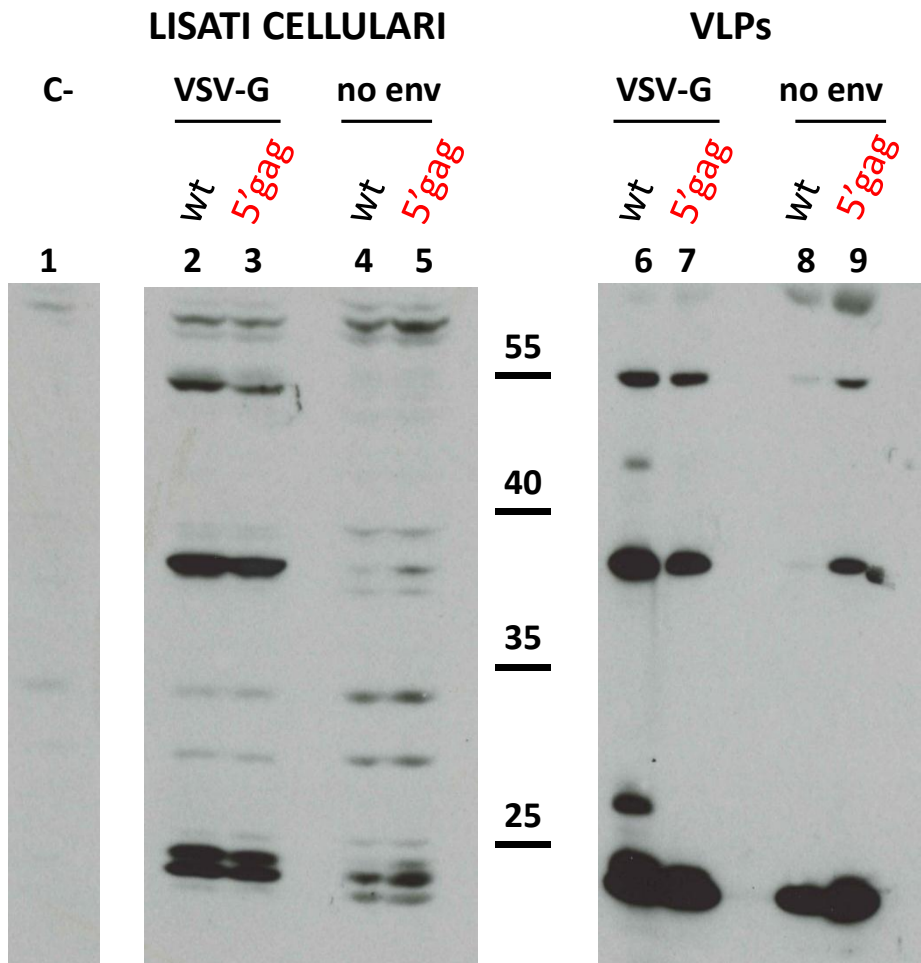


Figura 6.5. Analisi mediante Western Blotting dell'espressione di Pr55Gag e p24 nelle cellule 293T utilizzate per la trasfezione e nelle rispettive particelle rilasciate nel surnatante. **A.** Lisati cellulari e VLPs ottenuti trasfettando le cellule con pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT esprimente la regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente (5'gag) o wild type (wt) ed i plasmidi codificanti gli *envelope* HxBc2, 89.6 ed ELI di HIV-1. **B.** Lisati cellulari e VLPs ottenuti trasfettando le cellule con pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT esprimente la regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente (5'gag) o wild type (wt) ed i plasmidi codificanti gli *envelope* ADA, YU2 e JFR-L di HIV-1. **C.** Lisati cellulari e VLPs ottenuti trasfettando le cellule con pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT esprimente la regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente (5'gag) o wild type (wt) ed il plasmide codificante l'*envelope* eterologo VSV-G o senza *envelope* (no env).

Come si può osservare in figura 6.5., i risultati ottenuti sia nei lisati cellulari sia nei surnatanti sono in linea con quanto evidenziato dal saggio di attività retrotrascrittica (figura 6.5.A. e B.). In particolare, si nota un aumento di rilascio dei virioni ricombinanti contenenti la sequenza derivata dal paziente, indipendentemente dal tipo di *envelope* utilizzato, fatta eccezione delle particelle ricombinanti pseudotipizzate con l'*envelope* eterologo VSV-G (figura 6.5.C.). In tal caso la mancata correlazione con i dati ottenuti dal saggio di attività retrotrascrittica potrebbero essere dovuti ad un diverso contenuto proteico dei lisati.

6.6.4. Analisi del profilo di processamento da parte della proteasi *wild type* del precursore Pr55Gag contenente il sito di taglio MA/CA derivato da paziente

Allo scopo di valutare se le mutazioni a carico della regione N-terminale di Pr55Gag derivata da paziente avessero un impatto sulla capacità della proteasi virale di riconoscere il sito di taglio MA/CA, cellule 293T sono state trasfettate con il vettore pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT esprimente la sequenza 5'gag derivata dal paziente ed il rispettivo controllo *wild type*, in presenza del plasmide pRev, contenente il gene *rev* di HIV-1. A distanza di 16, 24 e 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte e lisate per l'estrazione delle proteine, mentre i surnatanti, contenenti le VLPs, sono stati purificati su cuscino di saccarosio e, in seguito, lisati. I campioni proteici ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e a successivo Western Blotting mediante l'impiego dell'anticorpo diretto contro la proteina p24.

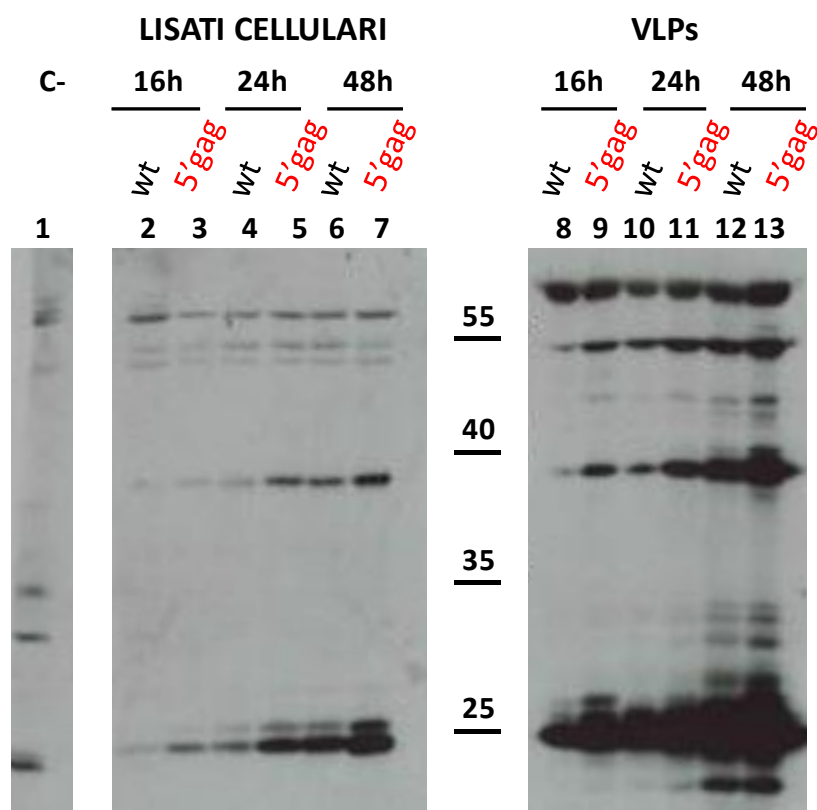


Figura 6.6. Analisi mediante Western Blotting del processamento di Pr55Gag in presenza (5'gag) o meno (wt) della regione N-terminale derivata dal paziente. Le cellule trasfettate con i plasmidi pSVC21vpr⁺vpu⁺nef⁺rev⁻Δenv-CAT esprime la sequenza 5'gag derivata dal paziente o il rispettivo controllo *wild type* e pRev sono state raccolte a 16, 24 o 48 ore dalla trasfezione.

Dal risultato ottenuto, riportato in figura 6.6., non si evidenziano differenze nel *pattern* di processamento tra il precursore poliproteico che porta il sito di taglio MA/CA derivato dal paziente ed il controllo costituito dalla poliproteina Pr55Gag *wild type*. Date le differenze quantitative nell'espressione dei due precursori poliproteici Pr55Gag osservate già a 16 ore, è stato necessario ottimizzare ulteriormente le condizioni di trasfezione in modo tale da minimizzare il livello di espressione del precursore Pr55Gag. Questo è stato ottenuto mediante riduzione della quantità di plasmide codificante Rev, usato nel protocollo di trasfezione. A distanza di 24 ore le cellule sono state raccolte, opportunamente lisate ed il contenuto proteico è stato determinato. I campioni proteici ottenuti, lisati cellulari normalizzati e sovranatanti purificati, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica

in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting con anticorpo diretto contro la proteina CA.

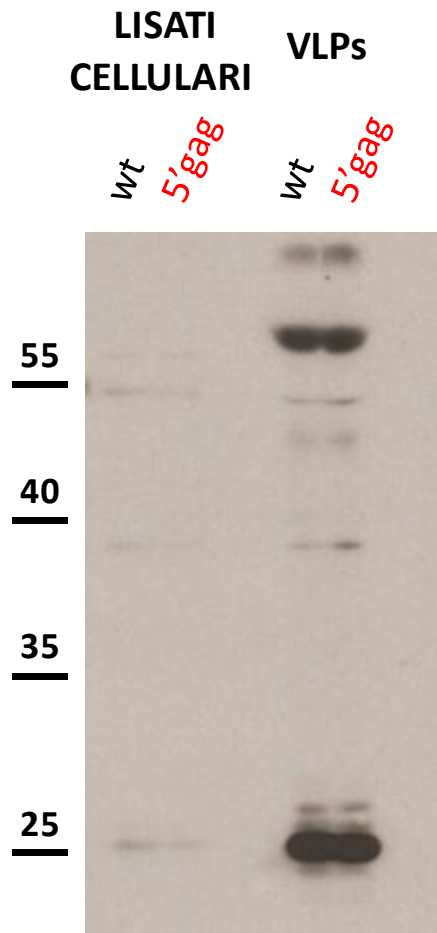


Figura 6.7. Analisi mediante Western Blotting del processamento di Pr55Gag contenente la regione N-terminale derivata da paziente rispetto al *wild type*. I lisati cellulari e le particelle simil-virali sono stati ottenuti ottimizzando le condizioni di trasfezione per ottenere la minima espressione di Gag sufficiente per l'analisi.

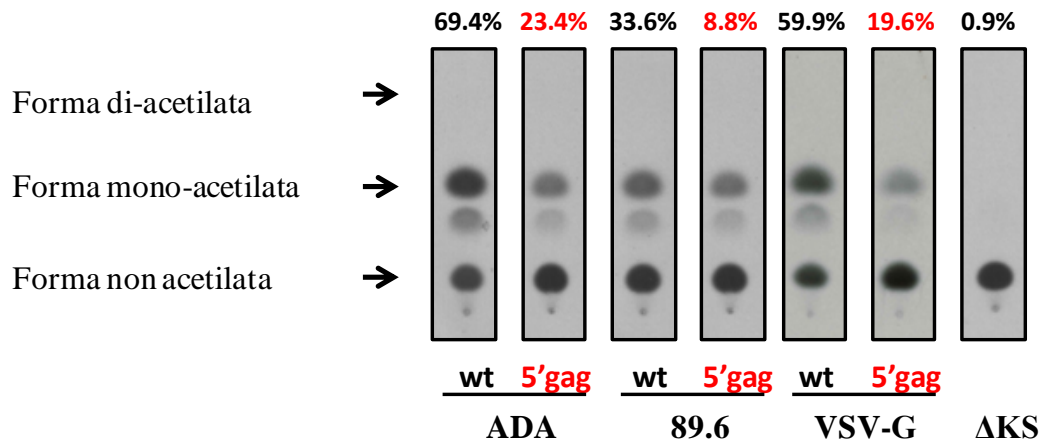
Come si può osservare in figura 6.7., i dati ottenuti permettono di escludere un effetto significativo sul processamento indotto dalla presenza delle sostituzioni e delle inserzioni che caratterizzano la regione N-terminale di Pr55Gag derivata dal paziente.

6.6.5. Analisi dell'infettività delle particelle virali esprimenti la regione N-terminale di Pr55Gag derivata dal paziente

Al fine di determinare il ruolo della regione N-terminale di Gag sull'infettività, i virus ricombinanti prodotti come descritto nel Paragrafo 5.2.14. sono stati utilizzati per trasdurre cellule bersaglio di origine monocito-macrofagica, isolate da sangue periferico di donatore sano. Poiché il virus ricombinante esprime il gene CAT, l'infezione può essere valutata da un punto di vista quantitativo mediante misurazione dell'attività cloramfenicolo acetiltransferasica nel lisato cellulare, dopo normalizzazione del contenuto proteico. Come controllo di infezione è stato utilizzato il virus ricombinante ottenuto impiegando il plasmide (Figura 20).

In particolare, cellule primarie di origine monocito-macrofagiche, sono state trasdotte con quantità normalizzate dei virioni ricombinanti. A 72 ore dalla trasduzione, le cellule sono state raccolte e lisate. Quantità equivalenti di lisato proteico sono state analizzate mediante saggio di attività acetiltransferasica (saggio CAT).

A.



B.

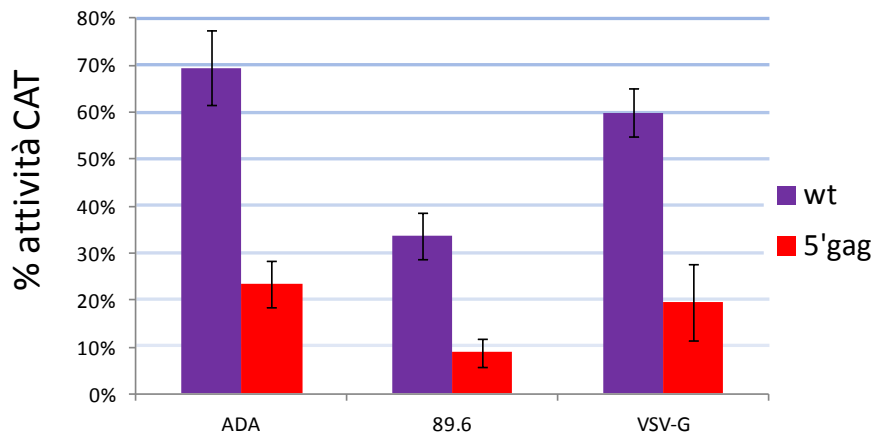


Figura 6.8. Analisi dell'infettività delle particelle esprimenti la regione N-terminale di Pr55Gag derivata dal paziente (5'gag) o *wild type* (wt), mediante saggio CAT sui lisati cellulari normalizzati di macrofagi primari trasdotti. A. Cromatografia su strato sottile dei prodotti di acetilazione del cloramfenicolo ottenuti dalla trasduzione delle cellule bersaglio con particelle pseudo tipizzate con gli *envelope* ADA e 89.6 di HIV-1 e l'*envelope* di controllo VSV-G. B. Risultati riportati come percentuale di conversione del cloramfenicolo marcato nelle sue forme acetilate. I valori riportati sono indicativi di almeno tre esperimenti indipendenti. Sono stati riportati il valore medio e la rispettiva deviazione standard.

In particolare, i risultati riportati in figura 6.8 indicano che l'espressione dell'enzima CAT nelle cellule trasdotte si riduce di più di tre volte quando i

virioni ricombinanti contengono la regione N-terminale della proteina Pr55Gag derivata dal paziente rispetto alla condizione *wild type*, siano essi pseudotipizzati con gli *envelope* macrofago-tropici di HIV-1 ADA ed 89.6 oppure con l'*envelope* eterologo VSV-G, utilizzato come controllo per il suo ampio tropismo d'ospite. Questo risultato suggerisce che mutazioni a carico della regione ammino-terminale di Pr55Gag possano influenzare negativamente fasi precoci dell'infezione, come l'ingresso, la retrotrascrizione o l'integrazione del virus nella cellula ospite.

6.6.6. Analisi genotipica della glicoproteina dell'*envelope* di HIV-1 gp41 nel paziente analizzato

Data la rilevanza funzionale della proteina MA nella corretta incorporazione delle glicoproteine di superficie nelle particelle virali neo-formate (Freed *and* Martin, 1995; Freed *and* Martin, 1996; Brandano *and* Stevenson, 2011), è possibile che i difetti di infettività precedentemente discussi siano riconducibili ad una non corretta incorporazione delle glicoproteine dell'*envelope* di HIV-1. *In vivo* questo meccanismo avrebbe sicuramente un impatto negativo sulla *fitness* virale, a meno che non intervengano meccanismi compensatori a carico della coda citoplasmatica della gp41, la componente dell'*envelope* con cui MA interagisce direttamente. Infatti, è noto che i difetti di incorporazione possono essere recuperati mediante la delezione della lunga coda C-terminale della gp41 (Bhatia *et al.*, 2007). A tal fine quindi, la regione del gene *env* codificante la gp41 è stata amplificata e sequenziata.

```

campA      AVGLGTLFLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVW 60
HXBc2      AVGIGALFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQARQLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVW 60
          ***:*.:.*****:*****:*****

campA      GIKQLQARVLAVERFLRDQQLLGIWGC SGKLICTTAVPWNTSWSNKSLTQIWDNMTWMEW 120
HXBc2      GIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTTAVPWNASWSNKSLTQIWNHTTWMEW 120
          *****:*****:*.:.*****:*****:***** ***::. *****

campA      EREINNYTELIYNLIEESQNQQEKNEKDLELDKWASLWNWFNITNWLWYIKIFIMIVGG 180
HXBc2      DREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGG 180
          :*****. ***:.*.*****:*.:.*****:*****:*****:*****

campA      LVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTRLPA PRGPDRPEGIEEEGGXRDRDRSXXLV DG 240
HXBc2      LVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTHLPT PRGPDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNG 240
          *****:*****:*.:.***** ***** ***:.*

campA      FLALIWDDLRSCLFSYHLLRDFLLIATR TVGLLGXRGEILKYWNLLQYXSQELKNSA 300
HXBc2      SLALIWDDLRSCLFSYHRLRDL LLIVTRIVELLGRRGWEALKYWNLLQYWSQELKNSA 300
          ***** ***** ***:.*.*** * *** ***** ***** *****

campA      ISLLNATAITVAEGTDRVIEVLQRACRAILHIPTRIRQGLERALL 345
HXBc2      VSLLNATAI AVAEGTDRVIEVVQACRAIRHIPRRIRQGLERILL 345
          :*****:*****:*. ***** ** ***** **

```

Figura 6.9. Allineamento della sequenza amminoacidica di gp41, con la sequenza di riferimento HxBc2, ottenuta dall'amplificazione e sequenziamento della rispettiva regione del gene *env* a partire dall'RNA estratto dal plasma del paziente 304 (programma bioinformatico ClustalW2).

L'allineamento con la sequenza amminoacidica del ceppo di riferimento HxBc2 riportato in figura 6.9. ha rivelato la presenza di una sostituzione amminoacidica a carico dell'amminoacido in posizione 236. Nel recente lavoro pubblicato da Waheed e collaboratori la mutazione di questo residuo comporta il taglio proteolitico della coda citoplasmatica della gp41 da parte della proteasi virale sia essa *wild type* o recante mutazioni di resistenza selezionate da PIs (Waheed *et al.*, 2007; Waheed *et al.*, 2010). È possibile quindi che i difetti di infettività osservati possano essere compensati *in vivo* da meccanismi che coinvolgono altri fattori virali, come ad esempio la gp41. Non si può comunque escludere che possa esserci un contributo da parte della regione C-terminale di Pr55Gag, il cui ruolo non è ancora stato analizzato, nel recupero delle capacità infettive del virus.

7. DISCUSSIONE

A livello mondiale sono circa 34 milioni le persone che convivono con l'infezione da HIV-1. Solo nel 2011, 2.5 milioni di persone hanno contratto l'infezione e una stima di circa 1.7 milioni sono decedute (<http://www.who.int/hiv/>). Grazie alla diffusione ed al continuo sviluppo di nuovi farmaci antiretrovirali, rispetto agli anni passati la morbilità e la mortalità associate all'AIDS sono state notevolmente ridotte (Bhaskaran *et al.*, 2008). I primi regimi terapeutici includevano un unico inibitore di categoria RTIs (*Reverse Transcriptase Inhibitors*, RTIs), la zidovudina (AZV) introdotta nel 1987, che difficilmente riusciva a controllare l'infezione per lunghi tempi. L'introduzione di nuove molecole in grado di inibire l'attività catalitica della proteasi virale (noti come *Protease Inhibitors*, PIs), molto più efficaci e con barriera genetica più alta rispetto ai precedenti, ha portato ad un miglioramento delle condizioni di vita dei pazienti sieropositivi (Huff *and* Kahn, 2001). Ma solo con l'avvento dell'approccio combinatorio, culminato nella *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART) a metà degli anni Novanta, la terapia dell'infezione da HIV-1 ha effettivamente trovato una svolta. Attualmente sono più di 20 gli inibitori approvati per uso clinico, in grado di agire negativamente in diverse fasi del ciclo replicativo virale: oltre agli inibitori del processo di retroscrittura (inibitori nucleosidici, NRTIs, e non nucleosidici, NNRTIs, della retroscrittasi) e della proteasi (PIs), sono disponibili molecole che bloccano l'ingresso del virus nella cellula bersaglio (come gli antagonisti dei corecettori e gli inibitori di fusione), l'integrazione del DNA provirale nel genoma dell'ospite (*Integrase Inhibitors*, IIs) o la maturazione delle particelle virali (rappresentati da bevirimat) (Cane, 2009). Gli inibitori della trascrittasi inversa e della proteasi virali sono utilizzati da più di vent'anni e costituiscono ancora oggi lo *standard of care* della terapia dell'AIDS. Negli anni sono emersi gli svantaggi indotti dall'uso dei farmaci antiretrovirali. Infatti, l'ampia diffusione e l'uso cronico di formulazioni che li contengono ha fatto emergere il problema relativo ai meccanismi di resistenza che frequentemente si osservano in pazienti HIV-1 positivi sottoposti ad HAART (Colafigli *et al.*, 2012). Se da un punto di vista clinico l'insorgenza di resistenze viene considerata indice di aderenza alla terapia da parte del paziente, da un altro pone il problema del continuo monitoraggio

delle farmacoresistenze a cui ciascun paziente deve essere sottoposto. Alla già difficile posologia quindi si aggiunge la necessità di una continua assistenza medica che si protrae per l'intera vita della persona affetta. I sistemi oggi disponibili per l'identificazione delle farmacoresistenze sono molti e vanno dai semplici test genotipici, che analizzano le mutazioni presenti a livello del genoma virale, a saggi più dispendiosi sia in termini di tempo che economici. Questi ultimi infatti prevedono l'impiego di un virus ricombinante per analizzare direttamente l'impatto sulla sensibilità ai farmaci di specifiche regioni del genoma virale isolato dal paziente. In ogni caso questi test considerano sufficientemente informative e attendibili le sequenze nucleotidiche codificanti i *targets* terapeutici. Attualmente sono disponibili tabelle, progressivamente aggiornate, sulle posizioni amminoacidiche dei bersagli della terapia coinvolte nella resistenza (Johnson *et al.*, 2010). Non mancano sistemi bioinformatici in grado di restituire un'analisi dettagliata del contributo di ciascuna sostituzione amminoacidica in termini di suscettibilità ai diversi tipi di inibitori in uso corrente (ad esempio lo *Stanford HIVdb drug-resistance algorithm*). Recentemente, grazie al contributo di diversi approcci, che vanno dalla caratterizzazione biochimica di proteine virali ricombinanti, alla determinazione della struttura tridimensionale, a studi biologici di mutagenesi sito specifica, fino ad analisi dei profili di resistenza sviluppati *in vitro*, sono stati caratterizzati i meccanismi molecolari che sottendono allo sviluppo delle resistenze che avvengono a livello dei bersagli terapeutici. Grazie a questi strumenti, stanno emergendo molecole di nuova generazione, sviluppate sugli stessi *targets* terapeutici, ma caratterizzate da una più alta barriera genetica, da più valenze o con diverso meccanismo d'azione rispetto agli inibitori oggi disponibili. Tuttavia, sono ancora molti i fattori che rimangono da determinare nel campo della farmacoresistenza. Ad esempio, spesso le mutazioni che compaiono *in vitro* non sono rappresentative della situazione che si osserva *in vivo*. Inoltre, i meccanismi di compensazione, in termini di capacità replicativa, che intervengono per sopperire alle carenze funzionali degli enzimi mutati sono ancora in parte da chiarire. Definire questi meccanismi è di primaria importanza perché, oltre a fornire indicazioni per lo sviluppo di nuove strategie farmacologiche, possono contribuire ad aumentare la conoscenza sulla biologia del virus, che rimane ancora in parte da determinare. Nel genoma di HIV-1 sono presenti tre geni principali,

gag, *pol* ed *env*, che codificano le proteine strutturali ed enzimatiche del virus. In particolare, il gene *gag* viene espresso come precursore poliproteico di 55 kDa, il Pr55Gag. La sintesi degli enzimi virali codificati dal gene *pol* avviene attraverso un intermedio poliproteico, Pr160GagPol, che si origina a causa di un evento di *frameshift* che interessa la regione intermedia tra i trascritti dei geni *gag* e *pol*. Entrambi sono sottoposti all'attività catalitica della proteasi virale che, solo dopo l'assemblaggio ed il rilascio della particella neoformata, porta alla maturazione delle componenti strutturali MA, CA, NC e p6 e degli enzimi PR, RT ed IN. Il gene *env* codifica le glicoproteine di superficie, gp120 e gp41, che vengono selettivamente incorporate nel virione, determinandone il tropismo. I prodotti dei geni virali *gag* e *pol* sono strettamente correlati tra loro, non solo in termini strutturali ma anche funzionali. A partire dal precursore Pr55Gag, ciascuna delle proteine mature che lo compongono, MA, CA, NC, p6 ed i due peptidi spaziatori p1 e p2, svolge un ruolo importante durante il ciclo replicativo del virus (Ganser-Pornillos *et al.*, 2008; Rein *et al.*, 2011). Il diretto coinvolgimento di ciascuna delle proteine strutturali di HIV-1, siano esse parte del precursore poliproteico Pr55Gag o nella loro forma matura, nei processi di retrotrascrizione e maturazione del virus, bersagli della terapia antiretrovirale basata su RTIs e PIs, li rende potenzialmente in grado di contribuire attivamente ai meccanismi di resistenza.

Nell'ambito delle farmacoresistenze è stato riscontrato che:

- (i) mutazioni che conferiscono resistenza ai PIs a livello della proteasi virale spesso sono compensate da mutazioni a carico dei siti di taglio in Pr55Gag che vengono riconosciuti dalla proteasi, tanto che si parla di “coevoluzione PR-Gag”. La caratterizzazione biochimica di questi processi ha dato un forte contributo alle conoscenze di attività catalitica dell'enzima, che non riconosce infatti una precisa sequenza amminoacidica, ma piuttosto una specifica conformazione assunta dai *loop* nei siti di taglio (Lee *et al.*, 2012). Gli amminoacidi che li compongono possono rendere più o meno accessibile il sito o influenzare l'affinità con cui viene riconosciuto, caratteristica responsabile della precisa regolazione temporale del processo di maturazione del virus;
- (ii) alcune mutazioni che conferiscono resistenza ai RTIs, sono in grado di influenzare la dimerizzazione della retrotrascrittasi (RT) ed in questo modo

inducono alterazioni nei meccanismi di processamento dei precursori poliproteici Pr55Gag e Pr55GagPol da parte della proteasi virale (Chiang *et al.*, 2012);

(iii) sostituzioni amminoacidiche in Pr55Gag che avvengono al di fuori dei siti di taglio selezionate *in vivo* dall'azione dei farmaci antiretrovirali hanno un impatto diretto sulla sensibilità agli inibitori, secondo un meccanismo non ancora chiarito (Dam *et al.*, 2009; Parry *et al.*, 2009).

Al fine di indagare il coinvolgimento di specifiche regioni della proteina Pr55Gag nei meccanismi di resistenza, in questo lavoro di tesi ci si è proposti di analizzare il contributo della regione genomica *gag* nei meccanismi di resistenza. Grazie alla collaborazione con il Prof. Parisi (Università degli Studi di Padova), abbiamo avuto accesso ai campioni clinici di pazienti HIV-1 positivi che fanno parte della coorte Veneta CAVeAT, a cui afferiscono cinque Unità di Malattie Infettive situate in Veneto. Dopo aver messo a punto le condizioni di amplificazione e sequenziamento dei geni *gag* di isolati virali ottenuti da campioni clinici, sono stati selezionati casi di pazienti in cui la terapia contenente PIs e RTIs era fallita. Il sistema sperimentale scelto per analizzare l'effetto delle mutazioni osservate *in vivo* in Pr55Gag si basa sull'utilizzo di un provirus caratterizzato da una delezione a carico del gene *env*, che lo rende capace di un singolo ciclo di replicazione, e da un gene reporter, che permette di saggiare l'infettività dei virioni. Sulla base del profilo di resistenza e delle caratteristiche di sequenza ricavate dall'analisi del gene *gag*, è stato scelto di analizzare l'effetto della regione N-terminale di Pr55Gag derivata da un solo paziente (304), in termini di: (i) rilascio, (ii) processamento ed (iii) infettività.

Inizialmente, è stato sviluppato un sistema di amplificazione e sequenziamento del gene *gag* a partire dall'RNA estratto dal plasma di pazienti HIV-1 positivi. Successivamente, in collaborazione con il Professor Parisi (Università degli Studi di Padova), sono stati selezionati casi clinici rilevanti di pazienti che avevano fallito terapie farmacologiche contenenti PIs e RTIs. La sequenza nucleotidica del gene *gag* è stata ricostruita e tradotta, per poi essere confrontata con quella di riferimento per i virus di sottotipo B, HxBc2, per identificare le posizioni variabili. Sulla base delle caratteristiche di resistenza e delle mutazioni riscontrate in Pr55Gag, è stato scelto di analizzare l'impatto della regione 5' del gene *gag*

derivata dal paziente 304 sul rilascio di particelle, sul processamento di Pr55Gag da parte della PR *wild type* e sull'infettività.

I risultati dei test genotipici di resistenza eseguiti sui campioni clinici presi in esame hanno evidenziato la presenza di molteplici mutazioni a carico delle regioni codificanti PR e RT, responsabili in 3 casi su 5 della perdita di sensibilità nei confronti di tutti i farmaci PIs e RTIs disponibili. La complessità individuale osservata, in termini di mutazioni primarie e compensatorie a carico dei due enzimi, è dovuta all'estensivo uso di diverse formulazioni farmacologiche ed ai numerosi parametri che guidano l'insorgenza di mutazioni, tra cui il tipo di inibitore utilizzato, l'ordine di esposizione a diversi inibitori, la durata dei trattamenti e la presenza di polimorfismi pre-esistenti.

I risultati ottenuti dall'analisi del gene *gag* nei pazienti considerati hanno evidenziato la presenza delle mutazioni a carico dei siti di taglio per la proteasi note per contribuire direttamente ai meccanismi di resistenza. Nello specifico, a livello del sito di taglio NC/p1 sono state osservate le sostituzioni A431V (nei pazienti numero 379 e 383) e K436R (presente nel caso clinico 298). Nel sito di taglio p1/p6 sono state riscontrate le mutazioni R452S (nei pazienti 379 e 383) e P453A/L (nei pazienti 379, 383 e 298). È noto in letteratura che queste mutazioni hanno un impatto sulla resistenza principalmente mediante meccanismi compensatori dell'attività proteolitica di PR (Nijhuis *et al.*, 2007; Kolli *et al.*, 2009; Nijhuis *et al.*, 2011; van Maarseveen *et al.*, 2012). In aggiunta, a livello di Pr55Gag sono state evidenziate sostituzioni amminoacidiche in posizioni diverse dai siti riconosciuti dalla proteasi. In letteratura, risultati ottenuti da studi indipendenti hanno dimostrato che in vivo mutazioni in diverse regioni di Pr55Gag sono in grado di influenzare la sensibilità agli inibitori e la capacità replicativa di virus resistenti in presenza di farmaci antiretrovirali (Dam *et al.*, 2009; Parry *et al.*, 2009; Shibata *et al.*, 2011). Data la numerosità dei siti coinvolti, al momento non sono disponibili studi atti a determinare lo specifico impatto che ciascuna posizione amminoacidica ha nei confronti della replicazione virale. Data la forte relazione strutturale e funzionale che esiste tra le diverse proteine virali è plausibile che la variazione in un dominio importante generi una cascata di riarrangiamenti volti a ristabilire la capacità replicativa del virus. È nota ormai la forte relazione che esiste tra la proteasi ed i suoi substrati poliproteici, ma

ancora poco studiati sono i contributi che ciascuno dei domini di Pr55Gag porta nel compensare i difetti di attività di PR ed RT indotti dalla presenza dei farmaci. Il profilo di resistenza del campione clinico numero 304 ha rivelato la presenza di una sola mutazione primaria a carico di PR e l'assenza di mutazioni di resistenza a RTIs. Nonostante si tratti di un'unica mutazione di resistenza, dal confronto della sequenza amminoacidica di Pr55Gag espressa dall'isolato in analisi con quella di riferimento è emersa la presenza, non solo di sostituzioni amminoacidiche a carico di tutti i domini, ma anche di inserzioni localizzate nei domini MA e p6. Inserzioni in p6 sono già state osservate *in vivo* in isolati virali di pazienti HIV-1 positivi e spesso, come nel caso in esame, includono duplicazioni del motivo PTAP, noto come dominio L (*Late-domain*) che funziona nelle fasi tardive dell'infezione come segnale per la gemmazione del virus (Strack *et al.*, 2003). Tali duplicazioni sembrano favorire il rilascio del virus dalla cellula infetta (Bates *et al.*, 2003; Brumme *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2011). Mentre non sono riportati casi *in vivo* di inserzioni a carico del dominio MA. Vista l'importanza funzionale svolta da questo dominio di Pr55Gag, abbiamo voluto indagare l'impatto di tali mutazioni sul ciclo replicativo di HIV-1.

Sfruttando la presenza di siti di restrizione unici la regione 5' *gag* derivata dal paziente è stata inserita direttamente nel genoma provirale ricombinante derivato da HIV-1 del sistema di *trans*-complementazione. Il vettore ricombinante impiegato contiene il DNA provirale completo del clone molecolare di HxBc2 ed i geni accessori *vpr*, *vpu* e *nef*, derivate rispettivamente dai cloni molecolari pNL4.3, BH10 e LAI. Il provirus è quindi in grado di esprimere le proteine accessorie essenziali *in vivo* per l'infettività del virus e la propagazione dell'infezione. Inoltre, nel gene *env* è stata introdotta una delezione di 580 pb che rende il virus competente per un solo ciclo di infezione. In sostituzione del gene *rev* è stato inserito il gene *reporter* della Cloramfenicolo Acetil-Transferasi (CAT). Attraverso una strategia di clonaggio disegnata *ad hoc* il sistema sviluppato permette di sostituire nel genoma provirale ricombinante le regioni 5' e/o 3' del gene *gag* o la parte del gene *pol*, che codifica PR e core catalitico di RT, derivate dal paziente. Attraverso la co-trasfezione in cellule 293T del plasmide contenente il genoma provirale ricombinante di HIV-1 assieme al plasmide codificante la proteina Rev e quello che fornisce *in trans* le glicoproteine

dell'*envelope*, è possibile produrre particelle virali ricombinanti che possono essere utilizzate per infettare cellule di interesse. In questo modo è possibile:

- (i) analizzare il contributo differenziale delle regioni N- o C-terminali di Pr55Gag o ancora dell'intera proteina, in un contesto di enzimi virali *wild type* che mantengono la loro attività catalitica, oppure ricreando l'intera situazione osservata nel paziente, con PR ed RT da esso derivate;
- (ii) valutare l'impatto di specifiche regioni di Pr55Gag sul rilascio di particelle lentivirali mediante saggio di attività retrotrascrittasi (*o RT assay*) e Western Blotting;
- (iii) analizzare l'infettività delle particelle ricombinanti in termini di attività acetil-transferasi correlata all'espressione del gene CAT;
- (iv) evidenziare l'eventuale contributo delle glicoproteine dell'*envelope* nell'infettività.

Questo sistema ci ha permesso di valutare l'effetto indotto dalla presenza della regione N-terminale di Pr55Gag derivata dal paziente in diversi aspetti della replicazione virale. I risultati ottenuti mediante saggio di attività retrotrascrittasi hanno portato a suggerire che le mutazioni e le inserzioni a carico di MA possano agire positivamente sulle fasi tardive del ciclo replicativo. L'analisi qualitativa dell'espressione di Pr55Gag ed il suo corretto processamento sono altri due aspetti che, sebbene non ancora sufficienti, devono essere considerati per avvalorare i risultati ottenuti con saggio RT. La valutazione dell'espressione del precursore Pr55Gag e della proteina matura CA a livello intracellulare e dei surnatanti mediante Western Blotting ha confermato che, rispetto alla condizione *wild type*, nelle particelle esprimenti la regione N-terminale di Pr55Gag derivata dal paziente ad un vantaggio in termini di attività retrotrascrittasi osservata corrisponde un aumento dell'espressione intracellulare e quindi di rilascio delle particelle similvirali a livello del surnatante. In conclusione, la presenza della regione 5'*gag* derivata dal paziente porta ad una maggior espressione/stabilità di Pr55Gag nelle cellule utilizzate per la trasfezione, che si traduce in un aumento del rilascio di virioni nel surnatante, indipendentemente dal tipo di envelope di HIV-1 utilizzato. Sebbene il dato sia significativo, non è possibile determinare con queste analisi il livello a cui le mutazioni considerate siano in grado di agire. È possibile infatti che siano coinvolti non solo il processo di trascrizione o traduzione dei geni virali,

ma anche i meccanismi che guidano il Pr55Gag attraverso il dominio MA verso la membrana plasmatica, essendo l'espressione di Pr55Gag sufficiente per la formazione ed il rilascio di VLPs (Campbell *et al.*, 1995).

Un'ipotesi plausibile poteva essere infatti che le inserzioni a carico della regione carbossi-terminale della matrice potessero influenzare l'esposizione o la conformazione del sito di taglio MA/CA, rendendolo più o meno accessibile all'attività proteolitica della PR virale. Se questo fosse stato il caso, *in vivo* tali inserzioni potevano contribuire a compensare ai difetti di attività catalitica dell'enzima mutato. A causa delle significative differenze quantitative tra campioni in analisi è stato necessario ottimizzare le condizioni sperimentali al fine di ridurre al minimo l'espressione dei precursori poliproteici. I risultati dell'esperimento descritto nel paragrafo 6.6.4. hanno portato ad escludere questa ipotesi.

Dall'analisi dell'infettività delle particelle virali esprimenti la regione N-terminale di Pr55Gag derivata dal paziente 304 è risultato che rispetto alla condizione *wild type*, l'ingresso del virus nella cellula bersaglio risulta compromesso. L'impatto di tali mutazioni potrebbe riguardare uno o più processi, che vanno dal posizionamento delle glicoproteine di superficie al processo di retrotrascrizione, in cui MA è direttamente coinvolta. In ogni caso, *in vivo* questo meccanismo avrebbe sicuramente un impatto negativo sulla fitness virale, a meno che non intervengano meccanismi compensatori. In un recente lavoro di Brandano *and* Stevenson è stato dimostrato che l'amminoacido in posizione 99 della coda C-terminale di MA è direttamente coinvolto nell'incorporazione dell'*envelope*. Se le sostituzioni amminoacidiche e le inserzioni a carico della regione C-terminale di MA in analisi avessero un impatto proprio su questo processo, i meccanismi di compensazione potrebbero riguardare la coda citoplasmatica della gp41, componente dell'*envelope* con cui MA interagisce direttamente. Infatti, è noto che i difetti di incorporazione possono essere recuperati mediante la delezione della lunga coda C-terminale della gp41. In uno studio recente sulla resistenza indotta *in vitro* da un potenziale farmaco antivirale, la sostituzione dell'amminoacido in posizione 236 della coda citoplasmatica della gp41 è stata associata alla comparsa di un sito di taglio riconosciuto sia dalla proteasi *wild type*, sia dalla proteasi con mutazioni primarie di resistenza (Waheed *et al.*, 2010). È possibile quindi che sia

questo il meccanismo che *in vivo* è in grado di compensare ai difetti di infettività osservati in questo ambito. Data la rilevanza funzionale della proteina MA nella corretta incorporazione dell'envelope di HIV-1 e nelle prime fasi dell'infezione, come parte dei complessi multiproteici di Retrotrascrizione (RTC) e di Pre-Integrazione (PIC) (Bukrinskaya, 2007), i nostri risultati saranno oggetto di ulteriore approfondimento.

Ogni tipo di conclusione va comunque contestualizzata. In questo lavoro infatti è stato valutato il solo impatto della regione N-terminale di Pr55Gag derivata dal paziente in un contesto di proteasi *wild type* e dove manca il contributo della regione C-terminale del precursore Pr55Gag derivato dal paziente. Quindi, se questo sistema può contribuire ad identificare nuove funzioni e meccanismi che particolari domini di Pr55Gag svolgono in virus ricostruiti *in vitro*, non è mai da dimenticare che ciascun risultato è indipendente dalla complessità dei fenomeni che possono influenzare l'abilità replicativa del virus *in vivo*.

8. BIBLIOGRAFIA

Agostini I, Popov S, Hao T, Li JH, Dubrovsky L, Chaika O, Chaika N, Lewis R, Bukrinsky M (2002). Phosphorylation of Vpr regulates HIV type 1 nuclear import and macrophage infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1;18(4):283-8.

Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. 11;76(5):853-64.

Alkhatib G, Combardiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA (1996). A Rantes MIP 1- , MIP 1- receptor as a fusion cofactor for Macrophage-tropic HIV-1. *Science*, 272: 1955-1958.

Aoki M, Venzon DJ, Koh Y, Aoki-Ogata H, Miyakawa T, Yoshimura K, Maeda K, and Mitsuya H (2009). Non-Cleavage Site Gag Mutations in Amprenavir-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Predispose HIV-1 to Rapid Acquisition of Amprenavir Resistance but Delay Development of Resistance to Other Protease Inhibitors. *J. Virol.* 83 (7), 3059-3068.

Arhel N (2010). Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*. 7:96.

Auewarakul P, Wacharapornin P, Srichatrapimuk S, Chutipongtanate S, Puthavathana P (2005). Uncoating of HIV-1 requires cellular activation. *Virology*, 20;337(1):93-101.

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

Bell NM and Lever AM (2012). HIV Gag polyprotein: processing and early viral particle assembly. *Trends Microbiol.* doi: 10.1016/j.tim.2012.11.006.

Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, Heneine W, Kantor R, Jordan MR, Schapiro JM, Vandamme AM, Sandstrom P, Boucher CA, van de Vijver D, Rhee SY, Liu TF, Pillay D, Shafer RW (2009). Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One.* 4(3):e4724.

Berger EA, Murphy PM, Farber JM (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol.* 17:657-700.

Bhatia AK, Campbell N, Panganiban A, Ratner L (2007). Characterization of replication defects induced by mutations in the basic domain and C-terminus of HIV-1 matrix. *Virology.* 369(1):47-54.

Bhaskaran K, Hamouda O, Sannes M, Boufassa F, Johnson AM, Lambert PC, Porter K (2008). Changes in the risk of death after HIV seroconversion compared with mortality in the general population. *JAMA.* 2;300(1):51-9.

Blattner W, Gallo RC, Temin HM (1988). HIV causes AIDS. *Science.* 29;241(4865):515-6.

Brandano L and Stevenson M (2012). A Highly Conserved Residue in the C-Terminal Helix of HIV-1 Matrix Is Required for Envelope Incorporation into Virus. *J Virol.* 86(4):2347-59.

Briggs JAG, Grunewald K, Glass B, Forster F, Krausslich H-G, Fuller SD (2006). The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure,* 14:15-20.

Brown PO (1997). Integration. In: J.M Coffin, Varmus HE, eds. *Retroviruses. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 161-203.

Brügger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, Kräusslich HG (2006). The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(8):2641-6.

Bukrinskaya AG (2004). HIV-1 assembly and maturation. *Arch Virol*. 149(6):1067-82.

Callebaut C, Stray K, Tsai L, Xu L, Lee W, Cihlar T (2007). In vitro HIV-1 resistance selection to GS8374, a novel phosphonate protease inhibitor: comparison with lopinavir, atazanavir and darunavir. *Antivir Ther*, 12:S18.

Callegaro A, Svicher V, Alteri C, Lo Presti A, Valenti D, Goglio A, Salemi M, Cella E, Perno CF, Ciccozzi M, Maggiolo F (2011). Epidemiological network analysis in HIV-1 B infected patients diagnosed in Italy between 2000 and 2008. *Infect Genet Evol*. (3):624-32.

Colafigli M, Torti C, Treçarichi EM, Albini L, Rosi A, Micheli V, Manca N, Penco G, Bruzzone B, Punzi G, Corsi P, Parruti G, Bagnarelli P, Monno L, Gonnelli A, Cauda R, Di Giambenedetto S; ARCA, UCSC and Brescia HIV resistance study groups (2012). Evolution of transmitted HIV-1 drug resistance in HIV-1-infected patients in Italy from 2000 to 2010. *Clin Microbiol Infect*. 18(8):E299-304.

Campbell S and Vogt VM (1995). Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*. 69, 6487–6497.

Cane PA (2009). New developments in HIV drug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 64 (1), 37–40.

Checkley MA, Lutttge BG, Freed EO (2011). HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *J Mol Biol.*410(4):582-608.

Cherrington J, Ganem D (1992). Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences. *EMBO J.* 11(4):1513-24.

Chiang CC, Tseng YT, Huang KJ, Pan YY, Wang CT (2012). Mutations in the HIV-1 reverse transcriptase tryptophan repeat motif affect virion maturation and Gag-Pol packaging. *Virology.* 422: 278-287.

Chowdhury IH, Wang XF, Landau NR, Robb ML, Polonis VR, Birx DL, Kim JH (2003). HIV-1 Vpr activates cell cycle inhibitor p21/Waf1/Cip1: a potential mechanism of G2/M cell cycle arrest. *Virology.* 20;305(2):371-7.

Chukkapalli V and Ono A (2011). Molecular determinants that regulate Plasma membrane association of HIV-1 Gag. *J Mol Biol* 410:512-524.

Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci.* 94(24):13193-7.

Coffin JM (1996). Retroviridae: The viruses and their replication. Chapter. 26 pg.763-843. In: *Fundamental Virology, Third Edition* edited by B N Fields, D M Knipe, P M Howley, et al. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Cohen EA, G Dehni, J Sodroski and WA Haseltine (1990). Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* 64:3097-99.

Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D (1998). HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 391:397-401.

Colunno R, Rose R, McLaren C, Thiry A, Parkin N, and Friborg J (2004). Identification of I50L as the signature atazanavir (ATV)-resistance mutation in treatment-naïve HIV-1-infected patients receiving ATV-containing regimens. *J. Infect. Dis.* 189:1802–1810.

Cote HC, Brumme ZL, Harrigan PR (2001). Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, ritonavir, and/or saquinavir. *J Virol*, 75:589–594.

Cullen BR (1993). Does HIV-1 Tat induce a change in viral initiation rights? *Cell.* 7;73(3):417-20.

Cullen BR (1998). Posttranscriptional regulation by the HIV-1 Rev protein. *Sem.Virol.* 8:327-34.

Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD.(1991). Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 4;324(14):961-4.

Dam E, Quercia R, Glass B, Descamps D, Launay O, Duval X, Krausslic HG, Hance AJ, Clavel F, ANRS 109 Study Group (2009). Gag mutations strongly contribute to HIV-1 Resistance to Protease Inhibitors in Highly Drug-Experienced Patients besides compensating for Fitness Loss. *PLoS Pathogens*, 5(3).

Davies JF 2nd, Hostomska Z, Hostomsky Z, Jordan SR, Matthews DA (1991). Crystal structure of the ribonuclease H domain of HIV-1 reverse transcriptase. *Science.* 5;252(5002):88-95.

Deora A and Ratner L (2001). Viral protein U (Vpu)-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of cellular proliferation. *J Virol.* 75(14):6714-8.

Domingo E, Escarmis C, Menendez-Arias L, Holland J (1999). Viral quasispecies and fitness variations. In Domingo E, Webster R, Holland J, editors. Origin and evolution of viruses. *San Diego: Academic Press*: 141-161.

Doms RW (2004). Unwelcome guests with master keys: how HIV enters cells and how it can be stopped. *Top HIV Med.* 12(4):100-3.

Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith-Burchnell C, Napier C, Webster R, Armour D, Price D, Stammen B, Wood A, Perros M (2005). Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(11):4721-32.

Doyon L, Payant C, Brakier-Gingras L, Lamarre D (1998). Novel Gag-Pol frameshift site in human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors. *J Virol.* 72(7):6146-50.

Dussupt V, Sette P, Bello NF, Javid MP, Nagashima K, Bouamr F (2011). Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are critical for late events of HIV-1 budding. *J Virol.*, 85(5):2304-15.

Esser MT, Graham DR, Coren LV, Trubey CM, Bess JW Jr, Arthur LO, Ott DE, Lifson JD (2001). Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation. *J Virol*, 75(13):6173-82.

Figueiredo A, Moore KL, Mak J, Sluis-Cremer N, de Bethune MP, Tachedjian G (2006). Potent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors target HIV-1 Gag-Pol. *PLOS Pathogens*, 2(11): e119.

Finzi D, Blankson J, Siciliano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gallant J, Siciliano RF (1999). Latent infection of

CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med.* 5(5):512-7.

Freed EO (1998). HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology.* 10;251(1):1-15.

Freed EO and Martin MA (1995). The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem.* 13;270(41):23883-6.

Freed EO and Martin MA (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol.* 70(1):341-51.

Freed EO (2001). HIV-1 Replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, Vol. 26, Nos. 1/6.

Fun A, Wensing AMJ, Verheyen J, Nijhuis M (2012). Human Immunodeficiency Virus gag and protease: partners in resistance. *Retrovirology*, 9:63.

Gaines H, von Sydow MA, von Stedingk LV, Biberfeld G, Bottiger B, Hansson LO, Lundbergh P, Sonnerborg AB, Wasserman J, Strannegaard OO (1990). Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS.* 4(10):995-9.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham PD (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science.* 224(4648):500-3.

Ganser-Pornillos BK, Yeager M and Sundquist WI (2008). The structural biology of HIV assembly. *Curr. Op. St. Biol.* 18: 203-217.

Garrett ED, Tiley LS, Cullen BR (1991). Rev activates expression of the human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr gene products. *J Virol.* 65(3):1653-7.

Gatanaga H, Suzuki Y, Tsang H, Yoshimura K, Kavlick MF, Nagashima K, Gorelick RJ, Mardy S, Tang C, Summers MF, Mitsuya H (2002). Amino acid substitutions in Gag protein at non-cleavage sites are indispensable for the development of a high multitude of HIV-1 resistance against protease inhibitors. *J Biol Chem.* 277:5952–5961.

Gatanaga, H., Das D, Suzuki Y, Yeh DD, Hussain KA, Ghosh AK and Mitsuya H (2006). Altered HIV-1 Gag protein interactions with cyclophilin A (CypA) on the acquisition of H219Q and H219P substitutions in the CypA binding loop. *J. Biol. Chem.* 281:1241–1250.

Gorry PR and Ancuta P (2011). Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep.* 8(1):45-53.

Göttlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(8):3195-9.

Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, Nadler J, Clotet B, Karlsson A, Wohlfeiler M, Montana JB, McHale M, Sullivan J, Ridgway C, Felstead S, Dunne MW, van der Ryst E, Mayer H; MOTIVATE Study Teams (2008). Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 359(14):1429-41.

Gupta RK, Kohli A, McCormick AL, Towers GJ, Pillay D, Parry CM (2010). Full-length HIV-1 Gag determines protease inhibitor susceptibility within in vitro assays. *AIDS,* 24:1651–1655.

Hazuda D, Iwamoto M, Wenning L (2009). Emerging pharmacology: inhibitors of human immunodeficiency virus integration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 49:377-94.

He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, Landau NR (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol.* 69(11):6705-11.

Helseth E, Kowalski M, Gabuzda D, Olshevsky U, Haseltine W, Sodroski J (1990). Rapid complementation assays measuring replicative potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein mutants. *J Virol.* 64(5):2416-20.

Henriet S, Richer D, Bernacchi S, Decroly E, Vigne R, Ehresmann B, Ehresmann C, Paillart JC, Marquet R (2005). Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J Mol Biol.* 354(1):55-72.

Herschhorn A and Hizi A (2010). Retroviral reverse transcriptases. *Cell Mol Life Sci.* 67(16):2717-47.

Hill CP, Worthylake D, Bancroft DP, Christensen AM, Sundquist WI (1996). Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications for membrane association and assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3099-3104.

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

Huff JR and Kahn J (2001). Discovery and clinical development of HIV-1 protease inhibitors. *Adv Protein Chem.* 56:213-51.

Hunter E (1994). Macromolecular interactions in the assembly of HIV-1 and other retroviruses. *Semin. Virol.* 5:71-83.

Jacks T, MD Power, FR Masiarz, PA Luciw, PJ Barr and HE Varmus (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 Gag-Pol expression. *Nature.* 331:280-83.

Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D., Schapiro JM, and. Richman DD (2010). Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: December 2010. *Top HIV Med.* 18(5):156-163.

Khan MA, Aberham C, Kao S, Akari H, Gorelick R, Bour S, Strebel K (2001). Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol.* 75(16):7252-65.

Kolli M, Lastere S, Schiffer CA (2006). Co-evolution of nelfinavir-resistant HIV-1 protease and the p1-p6 substrate. *Virology.* 347:405-409.

Kolli M, Stawiski E, Chappey C, Schiffer CA (2009). Human immunodeficiency virus type 1 protease-correlated cleavage site mutations enhance inhibitor resistance. *J Virol.* 83:11027–11042.

Lambert-Niclot S, Tubiana R, Beaudoux C, Lefebvre G, Caby F, Bonmarchand M, Naouri M, Schubert B, Dommergues M, Calvez V, Flandre P, Poirot C, Marcelin AG (2012). Detection of HIV-1 RNA in seminal plasma samples from treated patients with undetectable HIV-1 RNA in blood plasma on a 2002-2011 survey. *AIDS.* 26(8):971-5.

Larrouy L, Chazallon C, Landman R, Capitant C, Peytavin G, CollinG, Charpentier C, Storto A, Pialoux G, C. Katlama, P. M. Girard, P. Yeni, J. P. Aboulker, F. Brun-Vezinet, and D. Descamps on behalf of the ANRS 127 Study Group (2010). Gag Mutations Can Impact Virological Response to Dual-

Boosted Protease Inhibitor Combinations in Antiretroviral-Naïve HIV-Infected Patients. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. 54(7): 2910-2919.

Larrouy L, Charpentier C, Landman R, Capitant C, Chazallon C, Yeni P, Peytavin G, Damond F, Brun-Vezinet F, Descamps D; on behalf of the ANRS 127 study group (2011). Dynamics of gag-pol minority viral populations in naive HIV-1-infected patients failing protease inhibitor regimen. *AIDS*. 25(17):2143-2148.

Le Grice SFJ (1993). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. In: Skalka, A. M., Goff S. P., eds. Reverse transcriptase. Cold Spring Harbor, NY: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 163-191.

Lee PP and Linial ML (1994). Efficient particle formation can occur if the matrix domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag is substituted by a myristylation signal. *J Virol*. 68(10):6644-54.

Lee SK, Potempa M, Kolli M, Özen A, Schiffer CA, Swanstrom R. (2012). Context surrounding processing sites is crucial in determining cleavage rate of a subset of processing sites in HIV-1 Gag and Gag-Pro-Pol polyprotein precursors by viral protease. *J Biol Chem*; 287(16):13279-90

Loeb DD, Hutchison CA 3rd, Edgell MH, Farmerie WG, Swanstrom R (1989). Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 protease suggests functional homology with aspartic proteinases. *J Virol*. 63(1):111-21.

Lorizate M, Sachsenheimer T, Glass B, Habermann A, Gerl MJ, Kräusslich HG, Brügger B (2013). Comparative lipidomics analysis of HIV-1 particles and their producer cell membrane in different cell lines. *Cell Microbiol*.15(2):292-304.

Louis J, Landon MB, Gersnoviez RJ, Leveno KJ, Spong CY, Rouse DJ, Moawad AH, Varner MW, Caritis SN, Harper M, Wapner RJ, Miodovnik M, Carpenter M, Peaceman AM, O'Sullivan MJ, Sibai BM, Langer O, Thorp

JM, Ramin SM, Mercer BM; Maternal-Fetal Medicine Units Network, National Institute of Child Health and Human Development (2007).

Perioperative morbidity and mortality among human immunodeficiency virus infected women undergoing cesarean delivery. *Obstet Gynecol.* 110(2 Pt 1):385-90

Mansky LM and Temin HM (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol.* 69(8):5087-94.

Masuda, TV Planelles, P Krogstad and Chen ISY (1995). Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U3 att site: unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain. *J Virol.* 69:6687-96.

Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Strebel K, Benarous R (1998). A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell.* 1(4):565-74.

Matthews L, Chapman S, Ramchandani MS, Lane HC, Davey RT Jr, Sereti I. (2004). BAY 50-4798, a novel, high-affinity receptor-specific recombinant interleukin-2 analog, induces dose-dependent increases in CD25 expression and proliferation among unstimulated, human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Clin Immunol.* 113(3):248-55.

McKinnon K, Wainberg ML, Cournos F (2001). HIV/AIDS preparedness in mental health care agencies with high and low substance use disorder caseloads. *J Subst Abuse.* 13(1-2):127-35.

Menéndez-Arias L, Tözser J (2008). HIV-1 protease inhibitors: effects on HIV-2 replication and resistance. *Trends Pharmacol Sci.* 29(1):42-9.

Menéndez-Arias L (2010). Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. *Antiviral Research.* 85: 210-231.

Montagnier L (2010). 25 years after HIV discovery: Prospects for cure and vaccine. *Virology*. 397: 248-254.

Muriaux D, Mirro J, Harvin D, Rein A (2001). RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5246–5251.

Nijhuis M, van Maarseveen NM, Lastere S, Schipper P, Coakley E, Glass B, Rovenska M, de Jong D, Chappay C, Goedegebuure IW, Heilek-Snyder G, Dulude D, Cammack N, Brakier-Gingras L, Konvalinka J, Parkin N, Krausslich HG, Brun-Vezinet F, Boucher CA (2007). A novel substrate-based HIV-1 protease inhibitor drug resistance mechanism. *PLoS Med.* 4:e36.

Nishitsuji H, Yokoyama M, Sato H, Yamauchi S, Takaku H (2011). Identification of amino acid residues in HIV-1 reverse transcriptase that are critical for the proteolytic processing of Gag-Pol precursors. *FEBS letters*, 585: 3327-3377.

Oberlin E, Amara A, Bachelerie F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 382(6594):833-5. Erratum in: *Nature* (1996). 384(6606):288.

Oliveira T, Engelbrecht S, Janse van Rensburg E, Gordon M, Bishop K, zur Megede J, Barnett SW, Cassol S (2003). Variability at human immunodeficiency virus type 1 subtype C protease cleavage sites: an indication of viral fitness? *J Virol*. 77(17):9422-30.

Parolin C, Gatto B, Del Vecchio C, Pecere T, Tramontano E, Cecchetti V, Fravolini A, Masiero S, Palumbo M, Palù G (2003). New anti-human immunodeficiency virus type 1 6-aminoquinolones: mechanism of action. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47(3):889-96.

Peduzzi C, Pierotti P, Venturi G, Romano L, Mazzotta F, Zazzi M (2002). Performance of an in-house genotypic antiretroviral resistance assay in patients pretreated with multiple human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase inhibitors. *J Clin Virol.* 25(1):57-62.

Piantadosi A, Chohan B, Chohan V, McClelland RS, Overbaugh J(2007). Chronic HIV-1 infection frequently fails to protect against superinfection. *PLoS Pathog.* 3(11):e177

Piantadosi A, Chohan B, Panteleeff D, Baeten JM, Mandaliya K, Ndinya-Achola JO, Overbaugh J (2009). HIV-1 evolution in gag and env is highly correlated but exhibits different relationships with viral load and the immune response. *AIDS.* 23(5):579-87.

Parry CM, Kohli A, Boinett CJ, Towers GJ, McCormick AL, Pillay D (2009). Gag determinants of fitness and drug susceptibility in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 83 (18) 9094-9101.

Parry CM, Kolli M, Myers RE, Cane PA, Schiffer C, and Pillay D (2011). Three Residues in HIV-1 Matrix Contribute to Protease Inhibitor Susceptibility and Replication Capacity. *Antimicrobial Agents and chemotherapy.* 55(3): 1106-1113.

Pavlakakis GN, Schwartz S, D'Agostino D, Felber B (1992). Structure, splicing, and regulation of expression of HIV-1: a model for the general organisation of lentiviruses. In: Koff,WC, Kenndy RC., Wong-Staal F, (Ed) *AIDS Research Reviews*, (2): 41-63.

Peduzzi, C., P. Pierotti, G. Venturi, L. Romano, F. Mazzotta, and M. Zazzi (2002). Performance of an in-house genotypic antiretroviral resistance assay in patients pretreated with multiple human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase inhibitors. *J. Clin. Virol.* 25:57–62.

Pettit SC, Lindquist JN, Kaplan AH and Swanstrom R (2005). Processing site in the human immunodeficiency virus type I (HIV-1) Gag-Pro-Pol precursor are cleaved by the viral protease at different rates. *Retrovirology*, 2:66.

Pollard VW and Malim MH (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol.* 52:491-532.

Pongoski J, Asai K, Cochrane A (2002). Positive and negative modulation of human immunodeficiency virus type 1 Rev function by cis and trans regulators of viral RNA splicing. *J Virol.* 76(10):5108-20.

Rein A. (2010).Nucleic acid chaperone activity of retroviral Gag proteins. *RNA Biol.*;7(6):700-5.

Rhee, S. Y., M. J. Gonzales, R. Kantor, B. J. Betts, J. Ravela, and R. W. Shafer (2003). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acid Res.* 31:298–303.

Roux KH and Taylor KA (2007). Aids virus envelope structure. *Curr Opin Struct Biol.* 17(2):244-52.

Semenova EA, Marchand C, Pommier Y (2008). HIV-1 integrase inhibitors: update and perspectives. *Adv Pharmacol.* 56:199-228.

Serrao E, Odde S, Ramkumar K, Neamati N (2009). Raltegravir, elvitegravir, and metoogravir: the birth of "me-too" HIV-1 integrase inhibitors. *Retrovirology.* doi: 10.1186/1742-4690-6-25.

Sherman MP, Greene WC (2002). Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect.* 4(1):67-73.

Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H (2011). Within-host co-evolution of Gag P453L

and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case. *AntiviralRes.* 90(1):33-41

Skar H, Hedskog C and Albert J (2011). HIV-1 evolution in relation to molecular epidemiology and antiretroviral resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* ISSN 0077-8923.

Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell.*114: 689-699.

Swanstrom R, Wills JW (1997). Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In: Coffin H, Varmus HE, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 263-334.

Tachedjian G, Moore KL, Goff SP, Sluis-Cremer N (2005). Efavirenz enhances the proteolytic processing of an HIV-1 pol polyprotein precursor and reverse transcriptase homodimer formation. *FEBS Lett.* 579:379–384.

Tindall B, Cooper DA (1991). Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS.* 1991. 5(1):1-14.

van Maarseveen NM, Andersson D, Lepšík M, Fun A, Schipper PJ, de Jong D, Boucher CA, Nijhuis M. (2012). Modulation of HIV-1 Gag NC/p1 cleavage efficiency affects protease inhibitor resistance and viral replicative capacity. *Retrovirology.* (1): 9:29.

Varmus HE, Brown P (1989). *Retrovirus*, pp. 53-108. In D. Berg And M.M Howe (Ed), *Mobile DNA*. American Society For Microbiology Washington D.C.

Verheyen, J, Litau E, Sing T, Daumer M, Balduin M, Oette M, Fatkenheuer G, Rockstroh JK, Schuldenzucker U, Hoffmann D, Pfister H, and Kaiser R

(2006). Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naive and therapy-experienced patients. *Antivir. Ther.* 11:879–887.

Verheyen J, Knops E, Kupfer B, Hamouda O, Somogyi S, Schuldenzucker U, Hoffmann D, Kaiser R, Pfister H, Kucherer C (2009). Prevalence of C-terminal gag cleavage site mutations in HIV from therapy-naive patients. *J Infect.* 58:61–67.

Verheyen J, Verhofstede C, Knops E, Vandekerckhove L, Fun A, Brunen D, Dauwe K, Wensing AM, Pfister H, Kaiser R, Nijhuis M (2010). High prevalence of bevirimat resistance mutations in protease inhibitor-resistant HIV isolates. *AIDS*, 24:669–673.

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

Waheed AA, Ablan SD, Roser JD, Sowder RC, Schaffner CP, Chertova E, Freed EO. (2007). HIV-1 escape from the entry-inhibiting effects of a cholesterol-binding compound via cleavage of gp41 by the viral protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* (20):8467-71

Waheed AA, Ablan SD, Sowder RC, Roser JD, Schaffner CP, Chertova E, Freed EO. (2010). Effect of mutations in the human immunodeficiency virus type 1 protease on cleavage of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol.* 6:3121-6

White TA, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Meyerson JR, de la Cruz MJ, Bess JW, Nandwani R, Hoxie JA, Lifson JD, Milne JL, Subramaniam S (2010). Molecular architectures of trimeric SIV and HIV-1 envelope glycoproteins on intact viruses: strain-dependent variation in quaternary structure. *PLoS Pathog.* 6(12).

Wilén CB, Tilton JC, Doms RW (2012). Molecular mechanisms of HIV entry. *Adv Exp Med Biol.* 726:223-42.

Zhou Q, Sharp PA (1995). Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. *EMBO J.* 16;14(2):321-28.

Zhou J, Yuan X, Dismuke D, Forshey BM, Lundquist C, Lee KH, Aiken C, Chen CH (2004). Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by specific targeting of the final step of virion maturation. *J Virol.* 78(2):922-9.