



UNIVERSITÀ DI PISA

Scuola di Dottorato di Fisiopatologia Clinica e Scienze del Farmaco

Programma di Virologia Fondamentale e Clinica

Direttore Prof. Luca Ceccherini-Nelli

SSD: MED/07

**Studio del background genetico determinante la progressione dell'
infezione da HIV: confronto tra una coorte di individui sieropositivi e
individui "HIV Esposti Sieronegativi (HESN) "**

**Role of genetic factors in the progression of HIV infection: comparison
of a cohort of HIV-positive individuals and subjects
"HIV exposed seronegative (HESN)"**

Relatore: Prof. Luca Ceccherini-Nelli

Correlatore: Dott. Sergio Lo Caputo

Candidato: Alessandra Poggi

Anno Accademico 2013/2014

INDICE:

RIASSUNTO	pag 4
ABSTRACT	pag 6
INTRODUZIONE:	pag 9
Le coorti per lo studio del controllo dell'infezione da HIV	pag 9
La coorte HESN	pag 10
La coorte Long Term Non Progressor (LTNP)	pag 11
Controllo dell'infezione da HIV; varianti genetiche protettive	pag 13
Approccio del gene candidato, risultati	pag 14
Studi di associazione Genome-wide (GWAS): risultati	pag 25
Interazioni tra microRNA e HIV-1	pag 29
SCOPO DELLA RICERCA	pag 34
MATERIALI E METODI:	pag 38
Pazienti	pag 38
Raccolta dei campioni	pag 39
Genotipizzazione	pag 40
Test di screening per HIV-1	pag 45
Western Blot per HIV-1	pag 47
Rilevazione combinata delle Ig totali anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e dell'Ag p-24 di HIV-1 con ELFA	pag 49
Test quantitativo per la ricerca di p24	pag 50

Determinazione della viremia	pag 51
Tipizzazione Linfocitaria	pag 54
Raccolta dei dati clinici	pag 57
RISULTATI:	pag 59
Confronto tra le frequenze degli alleli e aplotipi protettivi della coorte di HESN e HIV+	pag 71
Studio delle descrittive bivariate e delle descrittive univariate per ogni singolo gene e aplotipo della coorte dei sieropositivi	pag 72
Studio delle Bivariate	pag 77
Studio delle Univariate	pag 121
Creazione e confronto di quattro sottogruppi compresi nella coorte HIV+	pag 126
Discussione, conclusioni, prospettive future	pag 138
Bibliografia	pag 143
Attività 2011-2014	pag 157
Ringraziamenti	pag 160

Riassunto:

Il virus HIV, isolato per la prima volta più di trent'anni fa, è stato decritto in molti suoi aspetti morfologici e patogenetici. Una rilevanza sempre maggiore è stata conferita al rapporto virus-ospite e soprattutto ai meccanismi di difesa contro l'infezione. Grazie a queste indagini, è stato possibile individuare gruppi di pazienti che riescono a controllare l'infezione anche per molti anni.

Questi soggetti costituiscono il gruppo dei "Long Term Non Progressor" (LTNP). Tra gli LTNP è possibile individuare un sottogruppo definito "Elite Controller" (EC) che, oltre ad un valore di linfociti CD4+ nella norma, presenta bassi livelli plasmatici di HIV RNA anche a distanza di anni dall'infezione. Inoltre sono stati osservati soggetti che, nonostante ripetute esposizioni al virus, non presentano infezione da HIV. Questi soggetti definiti HIV Exposed Seronegative (HESN), non evidenziano sierconversione e nel loro plasma non sono rivelabili né acido nucleico né antigeni virali. Questi soggetti sono caratterizzati da peculiarità immunologiche che evidenziano una risposta specifica del sistema immunitario nei confronti del virus HIV.

Con il progredire degli studi sul genoma umano sono stati identificati loci che comprendono geni in grado di modulare molti meccanismi di immunità virus specifici. E' in questo ambito che si inserisce lo studio e la caratterizzazione della risposta immunitaria contro agenti infettivi virali descrivendo i geni coinvolti in questi processi per cercare di capire le ragioni alla base della differenza tra risposte immunitarie contro lo stesso agente patogeno. I metodi di studio utilizzati sono sia l'approccio del gene candidato che lo studio di associazione Gene Wide (GWAS). Grazie a

questi due metodi sono stati individuati molti geni che in determinate varianti o associati in aplotipi contribuiscono allo stato di HESN.

In particolare , in questo studio sono stati presi in considerazione cinque geni che rivestono un ruolo determinante per la risposta immunitaria: MX2, TLR3, APOBEC3H, ERAP2, RAC2.

Nel nostro studio la frequenza di queste varianti geniche è stata valutata in una coorte di 101 pazienti HESN e in una di 79 pazienti sieropositivi. Nel gruppo dei soggetti HESN il 30,70% possiede due varianti protettive su quattro, il 69,30% ne possiede una o nessuna. Nella coorte di pazienti HIV+ l'1,26% (un solo paziente) possiede quattro varianti protettive, un altro 1,26% ne possiede tre, il 15,20% presenta due varianti protettive, il restante 82,28% una o nessuna. Successivamente abbiamo determinato se vi sia una qualche associazione tra ognuna di queste varianti e i dati clinici (sesso, periodo di infezione HIV, fattore di rischio, presenza o meno di livello di CD4+>500, ultima VL rilevabile, tempo di soppressione della VL, evoluzione clinica, assunzione di terapia, aderenza alla terapia HAART) e di laboratorio (Linfociti CD4+ Basali, ultimi CD4+, nadir CD4+, VL basale, anni di terapia) dei pazienti sieropositivi. Infine abbiamo creato quattro sottogruppi di sieropositivi in base al numero di varianti protettive possedute e abbiamo calcolato anche in questo caso il grado di associazione con i dati clinici e di laboratorio. Dall'analisi statistica, al momento, è emersa una probabilità di correlazione superiore al 95% tra sesso femminile e TLR3(p=0,02), tra assenza di evoluzione clinica e ERAP2(p=0,01). L'esiguo numero di soggetti osservati non consente di effettuare al momento correlazioni tra le caratteristiche genetiche esaminate e l'evoluzione dell'infezione da HIV nella popolazione

esaminata senza ulteriori prove. Tuttavia questi dati preliminari suggeriscono la necessità di approfondire queste ipotesi di studio.

Le variabili individuali, l'estrema diversità tra i pazienti, il relativo piccolo numero di soggetti esaminati possono impattare su questi risultati. Anche la terapia HAART e l'insorgenza di farmacoresistenze può impattare sulla risposta immunitaria e sulla replicazione virale. La multifattorialità del fenomeno di resistenza all'HIV deve tener conto di un più ampio numero di geni coinvolti nella risposta immunitaria e della loro espressione. Per questo motivo sono necessari ulteriori studi per una maggiore comprensione di questo fenomeno.

ABSTRACT:

The HIV virus, isolated for the first time more than thirty years ago, has been described in many morphological and pathogenic aspects. More and more importance was given to the virus-host relationship and especially the mechanisms of defense against infection. Thanks to these investigations, it was possible to identify groups of patients that are able to control the infection even for many years.

These individuals constitute the group of "Long Term Non Progressor" (LTNP). Among the LTNP is possible to identify a subgroup defined "Elite Controller" (EC), which, in addition to a value of CD4 + lymphocytes in the standard, has low levels of plasma HIV RNA even after decades after infection. Moreover, subjects were observed that, despite repeated exposure to the virus, does not have HIV infection. These subjects defined HIV Exposed seronegative (HESN), do not undergo seroconversion and in their plasma are not detectable nucleic acid nor viral antigens. These

subjects are characterized by immunological peculiarity that show a specific response of immune system against the HIV virus.

With the progress of studies on the human genome were identified loci that include genes that can modulate several mechanisms of virus-specific immunity. The study and the characterization of the immune response against viral infectious agents fits into this context and describes the genes involved in these processes trying to understand the reasons for the difference between immune response against the same pathogen. The study methods used are either the candidate gene approach that the study of Gene Wide Association (GWAS). Thanks to these two methods have been identified many genes that in specific single variants or associated in haplotypes contribute to the state of HESN.

In particular, in this study were considered five genes that play a key role for the regulation of immune response : MX2, TLR3, APOBEC3H, ERAP2, RAC2.

In our study the frequency of these gene variants was evaluated in a cohort of 101 subjects HESN and one of 79 HIV-positive patients. In the group of subjects HESN 30,70% has two protective variants of four, the 69,30% has one or none. In the cohort of HIV-positive patients, 1,26% (one patient) has four protective variants, another 1,26% owns three, the 15,20% has two protective variants, the remaining 82,28% one or none. We then determined whether there is any association between each of these variants and clinical data (gender, period of HIV infection, risk factor, level of CD4 > 500 num/mm³, last VL detectable, time suppression of VL, evolution clinic, taking HAART therapy, adherence to HAART) and laboratory (CD4 + basal, last CD4 +, CD4 + nadir, VL baseline, years of therapy) of seropositive patients. Finally, we have created four subgroups of HIV-positive according to the number of protective variants owned and

we have also calculated in this case the degree of association with clinical and laboratory data. From the statistical analysis, at the time, there was a probability of greater than 95% correlation between female gender and TLR3 ($p=0,02$) and between the clinical evolution and ERAP2 ($p=0,01$). In the population examined at the moment, the small number of subjects observed is unable to make correlation between the genetic characteristics studied and the evolution of HIV infection without further testing. However, these preliminary data suggests the need for further study of this hypothesis.

Individual variables, the extreme diversity among patients, the relative small number of examinees may impact on these results. Even HAART therapy and the onset of drug resistance can impact the immune response and viral replication. The multifactorial nature of the phenomenon of resistance to HIV must take account of a larger number of genes involved in the immune response and their expression. For this reason, further studies are needed for a better understanding of this phenomenon.

Introduzione:

La suscettibilità e la progressione dell'infezione da HIV-1 sono strettamente dipendenti da una variabilità inter-individuale e, nella maggioranza dei casi, dall'eterogeneità genetica. Gli studi fino ad ora condotti sui fattori che nell'ospite determinano la suscettibilità al virus e la replicazione virale dimostrano che esiste un insieme di caratteristiche genetiche che influenzano l'andamento dell'infezione. I fattori genetici dell'ospite associabili alla resistenza all'infezione da HIV-1 o alla mancata progressione in AIDS, non sono però sufficienti a giustificare il fenomeno di suscettibilità differenziale al virus. Il fenotipo resistente all'infezione da HIV-1 è la risultante di una combinazione di più fattori genetici, immunologici, ambientali perciò la sua comprensione necessita di approcci multidisciplinari.

Le coorti per lo studio del controllo dell'infezione da HIV:

Molti sono i fattori genetici che influenzano la suscettibilità a HIV-1. Il primo dato che avvalorò questa ipotesi risale al 1996, anno in cui fu scoperto che la variante allelica della chemochina recettore CCR5 (il principale recettore cellulare per il virus R5-HIV-1) denominata $\Delta 32$ quando presente in omozigosi conferisce una quasi assoluta protezione all'infezione da HIV-1 sessualmente trasmessa [1, 2]. Sulla base di questa osservazione sono state sintetizzate molecole capaci di bloccare l'entrata del virus nelle cellule suscettibili e nel 2009 è stato eseguito un trapianto di cellule staminali CCR5 $\Delta 32/\Delta 32$ in un paziente HIV positivo che sembra aver eliminato l'infezione [3]. Recentemente Draenert e collaboratori hanno osservato che gemelli omozigoti infettati con lo stesso ceppo virale

subiscono una progressione di malattia simile, al contrario di ciò che si osserva in gemelli eterozigoti [4]. Questi dati hanno spinto i ricercatori a evidenziare i fattori di restrizione genetica dell'ospite capace di influenzare la suscettibilità al virus, determinando le caratteristiche genetiche degli individui che presentano una risposta all'infezione particolare. Gli individui che meglio si prestano a questi studi, sono raggruppati in due coorti: il gruppo HESN (HIV exposed sieronegative individuals) e il gruppo LTNP (long-term non progressors).

La coorte HESN:

I primi studi epidemiologici eseguiti dall'UCLA Multicenter AIDS Cohort Study (MACS) [5] indicavano che esisteva un piccolo gruppo di maschi omosessuali che, nonostante i numerosi rapporti sessuali non protetti con persone HIV-1 positive (qui di seguito HIV-1 +), non presentava seroconversione o tracce di genoma virale nel sangue. Tuttavia, nel loro pool di cellule bianche periferiche fu possibile determinare la presenza di linfociti T-helper specifici per HIV-1. Questi dati suggerirono l'esistenza di una protezione di natura genetica e/o immunologica [6]. In seguito, Plummer e collaboratori presentarono un lavoro che descriveva la differente suscettibilità al virus HIV-1 in un gruppo di prostitute keniane [7,8]. La resistenza all'infezione da HIV è stata inoltre, documentata in soggetti consumatori di droga per via endovenosa (IDU), operatori sanitari esposti accidentalmente al virus, in soggetti omo ed eterosessuali che avevano rapporti non protetti con partner abituali HIV-1+ ed emofilici che avevano ricevuto prodotti della coagulazione infettati [9]. Un particolare gruppo di HESN è rappresentato da bambini sieronegativi nati da madri HIV-1+. La peculiarità di questo gruppo è dovuta al fatto che non sono infetti alla nascita nonostante la continua esposizione all'ambiente

materno saturo di virus durante la gestazione, ma sono sieropositivi a causa degli anticorpi anti-HIV trasferiti dalla madre al feto. Numerosi studi hanno cercato di evidenziare i correlati immunologici e genetici dell'ospite che conferiscono a questo gruppo protezione dall'HIV, ma nessuno dei meccanismi fino ad ora scoperti sono in grado di spiegare completamente questo fenomeno. Inoltre, per molti anni i risultati ottenuti da diversi gruppi di studio non sono stati comparabili perché mancava una definizione che caratterizzasse in maniera univoca il paziente HESN. Solo nel 2010 durante la convention di Rockville sono state definite le caratteristiche del paziente HESN (JID Volume 202 Supplement 3 Novembre 1, 2010). Nonostante molte coorti HESN siano state identificate e approfonditamente studiate, molte informazioni chiave sono ancora mancanti. Per esempio ancora non è chiaro il contributo genetico e immunologico alla resistenza al virus. Inoltre è quasi impossibile studiare questo fenomeno nelle fasi precoci, poiché l'evidenza fenotipica di HESN è per sua definizione riscontrabile in seguito a ripetuti contatti con il virus in un periodo che comprende anni. Perciò i ricercatori osservano e paragonano le conseguenze di vari cambiamenti immunologici che probabilmente si sono verificati anni prima della definizione di HESN. Una volta che una variante genetica viene associata ad un fenotipo protettivo, è possibile eseguire test con infezioni ex vivo su cellule isolate da controlli positivi portatori della stessa mutazione.

La coorte Long Term Non Progressor (LTNP):

Dopo alcuni anni dall'inizio dell'epidemia di AIDS, è stata individuata una minoranza di pazienti HIV-1+ che, nonostante il lungo periodo di sieropositività, non presentava segni o sintomi di AIDS. Questi soggetti sono identificati come Long-Term Non Progressor (LTNP) e rappresentano

circa il 2-5% di tutti i soggetti sieropositivi.[10] In contrasto con la rapida progressione della malattia a cui si assiste quando non venga somministrata alcuna terapia antiretrovirale, i pazienti LTNP che in alcuni casi sono sieropositivi da 20-25 anni, mantengono una bassa carica virale plasmatica e alti livelli di CD4+ senza nessuna terapia. Anche in questo caso i risultati ottenuti da vari studi su questa coorte risultano di difficile comparazione soprattutto per l'eterogeneità della coorte e dei criteri di inclusione[11,12].

Questo gruppo è a sua volta divisibile in due sotto coorti: LTNP ed Elite Controllers (EC) ed Elite suppressors. Il gruppo EC è caratterizzato dall'assenza di viremia (<50 copie/ml) persistente senza l'ausilio della terapia antiretrovirale. Picchi di viremia superiori alle 1000 copie/ml non sono un criterio di esclusione dal gruppo EC quando sia un fenomeno isolato o non consecutivo a un altro[13,14]. E' al momento impossibile prevedere se un paziente LTNP o EC svilupperà in futuro AIDS, ma Madec e Hunt hanno osservato pazienti con queste caratteristiche che dopo aver controllato per molto tempo l'infezione hanno sviluppato AIDS [15,16].

E' possibile riassumere le caratteristiche dei differenti gruppi d'individui con una risposta non-classica a HIV nella seguente tabella:

	Linfociti T CD4+ (cell/mm³)	Carica virale plasmatica (copie/ml)	IgG antiHIV- 1	IgA anti HIV-1	Cellule T HIV-1 specifiche	HAART
HESN	>500	Negativa	-	+	+	-
LTNP	>500	<10000	+	+	+	-
EC	>500	<50	+	+	+	-
HIV-1	<500	>10000	+	+	+	+

Controllo dell'infezione da HIV; varianti genetiche protettive:

L'integrazione tra gli studi del genoma e l'approccio al gene candidato ha permesso di identificare un cospicuo numero di varianti genetiche implicate nella progressione dell'infezione da HIV in AIDS. Poiché non è stato possibile replicare in altri laboratori molti dei dati raccolti, sono stati proposti dei criteri per la definizione di fattore genetico di protezione [17].

Questi criteri includono:

- Lo studio di un grande numero di casi clinici
- Test multipli con correzioni statistiche
- Riproducibilità di dati significativi in popolazioni, etnie,coorti differenti
- Correlazione tra polimorfismi in esame, cambiamenti quantitativi e qualitativi nei corrispondenti prodotti genetici e progressione dell'infezione in AIDS.

Approccio del gene candidato, risultati:

L'approccio del gene candidato nel condurre uno studio genetico di associazione si focalizza sulla correlazione tra varianti alleliche di geni di interesse e stati fenotipici normali o patologici. Il principio di questo metodo è che certe mutazioni possono impattare direttamente sulle funzioni del gene studiato e provocare fenotipi alterati o contribuire all'insorgenza di patologie. Gli studi condotti con il metodo del gene candidato implicano una conoscenza a priori del ruolo di un determinato gene nella patogenesi di HIV [18]. Questo approccio considera in maniera selettiva solo le varianti di un determinato gene implicato nel ciclo vitale del virus o nella risposta immunologica al virus, escludendo quindi geni non identificati potenzialmente capaci di interferire con l'infezione. Tale limite è solo apparente: infatti, la maggior parte delle restrizioni genetiche legate allo sviluppo di AIDS determinate con questo metodo sono state poi confermate da studi del genoma e sono quasi tutte comprese nel locus di HLA classe I [19]. I geni HLA di classe I sono altamente polimorfici che codificano proteine transmembranarie che legano antigeni precedentemente processati all'interno della cellula presentandoli ai linfociti T CD8 positivi (CD8+) [20]. Le varianti alleliche di questo locus sono moltissime e determinano la differente efficienza della processazione antigenica[21]. Per questo motivo persone con differenti alleli di HLA possono montare risposte immunologiche contro i patogeni con differente protettività. Poiché gli alleli di questo locus legano le varianti epitopiche del virus con caratteristiche quantitative e qualitative peculiari, i vari HLA possono essere associati a differenze nell'esito dell'infezione da HIV-1 [22,23].

Ad esempio, è stato confermato da molti studi indipendenti tra loro l'effetto protettivo di HLAB57. I linfociti T citotossici (CTL) HLAB57-ristretti sono capaci di riconoscere e legare molti peptidi di HIV-1 e le varianti alleliche B5701 e B5703 (presenti il primo nella maggioranza degli individui caucasici e il secondo negli africani) mostrano un'ampia cross-reattività sia contro epitopi dominanti di gag comuni che quelli più rari e sono associati a una lenta progressione dell'infezione da HIV [24-28]. Allo stesso modo, l'espressione di HLAB*27 ha un effetto protettivo poiché mantiene saldo il legame tra la tasca HLA B e l'arginina in posizione 2 del peptide gag. Per questo motivo, mutazioni in questa posizione conducono ad instabilità del complesso B27-gag e ad una più veloce progressione in AIDS [29-31]. Viceversa, l'allele B*35 è stato associato ad una più rapida progressione di malattia [32]. In particolare, Carrington e collaboratori hanno dimostrato come l'aplotipo B*35-Cw*04 sia associato significativamente con lo sviluppo della malattia in pazienti caucasici, ma non in soggetti afroamericani [33]. Lavori successivi hanno invece descritto l'associazione tra l'allele sottotipo B*35-Px e un più rapido sviluppo di AIDS [23]. Probabilmente questo allele riduce la capacità di riconoscere i peptidi di HIV provocando una scarsa e poco efficace risposta immunologica contro il virus. Infine è stato dimostrato che l'eterozigosi per questo allele causa un più rapido sviluppo di malattia, consentendo di ipotizzare che l'allele B*35-Px eserciti un'influenza negativa nella patogenesi di HIV [23,34].

In un lavoro del 2008 ed in uno del 2009 è stato descritto come le varianti geniche di HLAB*57 e B*27 sono largamente espresse nei pazienti EC al contrario dei soggetti con una tipica progressione di malattia, infatti il 68% dei pazienti EC possiede almeno una variante protettiva degli alleli HLA (B5801, HLA B27, B1503, B13, B51) contro il 37 % dei pazienti con normale progressione [35,36]. I dati appena mostrati, indicano anche che circa un

terzo dei pazienti EC non presentano nessuno degli alleli “protettivi” del locus HLA. Perciò altri fattori devono contribuire allo status di EC di questi soggetti.

Gli alleli di HLA rivestono un ruolo chiave anche nello status di HESN. Per esempio, è stato osservato che la concordanza del complesso HLA di classe prima tra madre e feto causa un aumento dell'incidenza di trasmissione perinatale del virus, mentre una discordanza comporta una maggiore protezione, probabilmente in conseguenza alla risposta immune del feto al complesso MHC materno [37,38].

Recentemente, il fenotipo HESN è stato associato con ERAP2 (aminopeptidasi associato al reticolo endoplasmico di tipo 2), un altro gene coinvolto nel meccanismo di presentazione antigenica [39 e Biasin et al in stampa]. Questo enzima taglia i peptidi da montare sulla tasca delle molecole di HLA classe I rendendoli perfetti in lunghezza e crea il repertoire antigenico che viene presentato ai linfociti T CD8+.

Nella popolazione sono stati identificati due aplotipi per ERAP 2: aplotipo A e aplotipo B. L'aplotipo A riscontrato con un'alta frequenza negli individui HESN codifica una proteina di 960 aminoacidi mentre l'aplotipo B a causa di uno splicing alternativo codifica per la forma troncata di 534 aminoacidi (figura 1) [40].

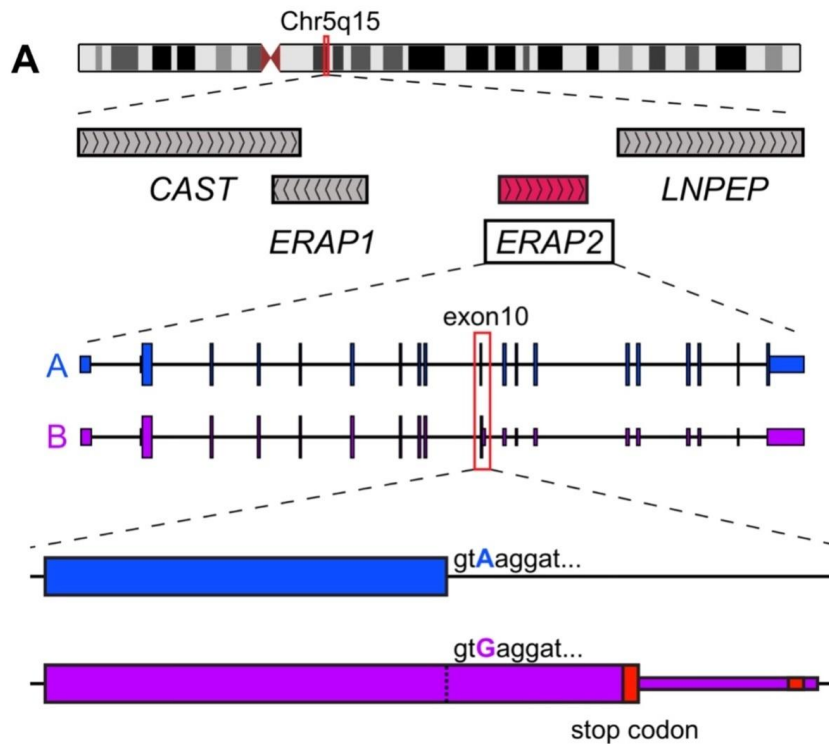


Fig.1:Organizzazione genomica della regione del cromosoma umano 5 che comprende ERAP2. I due aplotipi sono rappresentati in rosso (aplotipo A) e blu(aplotipo B).

I due aplotipi sono presenti nella popolazione con la stessa frequenza perciò è stato ipotizzato che vi sia una differenza funzionale tra di essi. Inoltre, dati finora raccolti indicano come queste due varianti determinino una diversa processazione degli antigeni di HIV e contribuiscano ad una diversa vulnerabilità all'infezione. Interessanti osservazioni derivano da studi di silenziamento condotti sul gene codificante la proteina ERAP1. È stato, infatti, stabilito che, in assenza di ERAP1, l'effetto complessivo esercitato sul processo di presentazione dell'antigene è fortemente dipendente dal genotipo HLA di classe I espresso dalla cellula. Alcuni alleli HLA di classe I sarebbero, infatti, maggiormente dipendenti dall'attività di ERAP1 rispetto ad altri che, probabilmente, associano preferenzialmente peptidi generati direttamente dal proteasoma o da aminopeptidasi citosoliche. Per eludere il controllo dell'immunità adattativa, HIV così come molti altri virus, provocano la diminuzione dell'espressione delle

molecole HLA di classe I, riducendo così la presentazione degli antigeni virali e la citolisi delle cellule infette da parte dei Linfociti T citotossici (CTL). Il meccanismo di evasione dell'azione dei CTL è contrastato dall'ospite dalle cellule Natural Killer (NK). Le NK sono in grado di distruggere cellule che non esprimono sulla loro superficie un'adeguata quantità di molecole HLA classe I e grazie alla molecola KIR (killer immunoglobulin like receptor) sono capaci di valutare il set di HLA sulle cellule bersaglio [41]. La maggior parte dei KIRs sono inibitori, ovvero il loro riconoscimento di HLA sopprime la citotossicità della cellula NK. I KIRs sono anche di natura attivante, in questo caso la loro attivazione arma la cellula NK.

L'associazione tra l'attivazione delle cellule NK e la resistenza all'infezione da HIV è stata stabilita da numerosi studi genetici.

Jennes e collaboratori, studiando un gruppo di prostitute africane HESN, hanno rilevato in questo l'alta frequenza di geni inibitori KIR in assenza dei geni HLA a loro associati e il genotipo AB KIR, caratterizzato da un'alta espressione di recettori KIR attivanti, è fortemente rappresentato. Nonostante il ridotto numero di individui esaminati, gli autori hanno ipotizzato che questo particolare profilo possa provocare una forte attività citolitica delle cellule infettate dal virus HIV-1 [42]. Altri studi mirati alla descrizione del recettore KIR3DS1, hanno dimostrato che l'attivazione delle cellule NK svolge un ruolo protettivo da HIV. L'omozigosi per il gene che codifica questo recettore è più frequente negli individui HESN piuttosto che nei pazienti HIV+ [43]. Inoltre, è stato dimostrato come la presenza di questo allele sia fortemente protettiva in presenza del suo (probabile) ligando HLAB [44]. Ultimamente è stato riscontrato che le variazioni sul numero delle copie di KIR attivanti e inibitori influenza

l'espansione periferica delle cellule NK KIR3DS1+, condizionando in maniera differente il controllo di HIV-1 post infezione[45].

Un'altra famiglia di molecole associate allo status di HESN è quella composta dalle chemiochine e dai corrispondenti recettori. Poiché la fase dell'entrata del virus HIV nella cellula dipende dai corecettori chemiochinici, sono stati svolti molti studi rivolti a capire come queste molecole modulino l'infezione virale. I dati di tali studi sono risultati a volte discordanti tra loro, ma hanno comunque evidenziato che non esiste un fattore che da solo fornisca protezione dall'infezione. In particolare sono stati studiati i polimorfismi del gene del corecettore CCR5 [46], le varianti genetiche di CCR2 (CCR2-64I) che sono in forte *linkage disequilibrium* con le mutazioni della regione regolatoria di CCR5[47,48], una sostituzione A-to-G nella posizione 801 all'interno della regione non codificata 3' del gene della chemiochina SDF-1 [48,49] e i polimorfismi responsabili dell'aumento dei livelli delle CC-chemiochine (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP1 α P) che bloccano l'infezione del virus R5-HIV-1 sia per competizione che per induzione dell'internalizzazione del recettore [13].

Recentemente l'analisi della relazione tra il numero di copie di CCL3L1 e la suscettibilità ad HIV-1 ha mostrato che i livelli di CCL3L1 sono inversamente proporzionali all'espressione di CCR5 sui linfociti CD4+ [50]. Ulteriori dati ottenuti osservando individui infettati con HTLV-2 indicano che la media del numero di copie di CCL3L1 e il rapporto CCL3L1/CCL3 mRNA è maggiore negli HESN e LTNP rispetto ai controlli sani HIV-non esposti (controlli sani, HC) [51]. Tuttavia, tre indipendenti studi del 2009 usando metodi aggiornati per quantificare il numero di copie geniche non sono riusciti a riprodurre questi risultati [52-54]. In ogni caso, sebbene moltissimi studi abbiano confermato un ruolo chiave delle chemiochine

nel controllo dell'infezione da HIV-1 sia per azione diretta chemiochina=virus grazie alla competizione per il recettore, che indiretta con l'internalizzazione del recettore stesso [55], gli stessi dati hanno dimostrato che l'azione protettiva di queste molecole non è assoluta, altri fattori sono coinvolti nel mantenimento dello status di HESN.

Nello studio dei correlati genetici in grado di conferire protezione all'infezione da HIV-1 ha assunto una grande importanza la regione cromosomica 22q12-13 [56].

Questa regione è omologa di quella sul cromosoma 15 murino dove mappa il locus Rfv3 il quale è responsabile della produzione di anticorpi neutralizzanti specifici per il virus di Friend [57]. Grazie ad un'analisi dei microsatelliti presenti su loci polimorfici compresi in questa regione del cromosoma umano 22, è stato evidenziato che questo locus comprende dei geni coinvolti nella resistenza ad HIV-1 [56], primo tra tutti APOBEC3 che mappa al centro di questa regione [58]. APOBEC3 comprende sette sottotipi (A, B, C, DE, F, G, H) con un apporto differente alla resistenza ad HIV-1; tra questi un ruolo determinante è svolto da APOBEC3G (A3G) che provoca una sostituzione di base G/A nel genoma virale nonostante l'azione della proteina VIF virale.

L'interferone (IFN) di tipo I, noto come potente antivirale, sembra aumentare l'espressione di A3G [57]; infatti, se cellule derivanti da individui HESN e coltivate *in vitro* vengono esposte al virus HIV, viene stimolata la produzione di IFN α il quale a sua volta induce una rapida e abbondante produzione di A3G capace di limitare la replicazione virale [57]. Jin e collaboratori hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione tra i livelli di A3G, il numero di linfociti CD4+ e i valori della viremia in una coorte di individui LTNP, ipotizzando che questo fattore possa avere un

ruolo nel controllo della replicazione virale. In più in un lavoro di Vazquez-Perez viene descritto un livello di A3G in soggetti HESN di molto superiore che in individui HC e viene rilevata una diminuzione della sua espressione in individui HIV+ ad un anno dalla seroconversione [59, 60].

Ciò nonostante la teoria di A3G come fattore determinante nel controllo di infezione non è universalmente accettata, poiché alcuni ricercatori non sono riusciti a duplicare questi dati né a trovare una corrispondenza tra l'espressione dei messaggeri di A3G e i valori dei CD4+ e di viremia, rilevando invece valori comparabili tra individui HESN e pazienti HIV+ di una coorte sudafricana [60,61].

Successivamente è stato studiato il gene di A3G nel tentativo di identificare varianti alleliche in grado di codificare proteine che eludessero l'azione di Vif o che, al contrario, ne aumentassero l'espressione. Sono stati analizzati molti SNP di questo gene e non è stato possibile associare nessuno di questi ad un fattore di resistenza; al contrario, alcuni sono maggiormente espressi in pazienti con una più veloce progressione di malattia. Ne è un esempio l'allele 186R, presente in maniera significativa negli afroamericani (37% contro il 3% dei caucasici) il quale è fortemente associato ad una rapida diminuzione dei CD4+ e ad una accelerata progressione dell'infezione in AIDS [62, 63]. Analogamente, l'allele C40693T è legato ad un aumento del rischio di infezione in individui HESN e una più rapida progressione di malattie in pazienti HIV+ [64]. Nessuna mutazione è stata per il momento identificata nella regione promotrice del gene, perciò è stato ipotizzato che A3G esplica la sua azione antivirale con la modulazione della sua espressione piuttosto che con variazioni della sua sequenza genica.

Recentemente è stata posta attenzione su un altro componente della famiglia APOBEC, APOBEC3H. E' stato, infatti, osservato che un suo aplotipo Hapl è associato con la protezione dal virus HIV-1 quando trasmesso per via sessuale. Hap I determina la produzione di una variante proteica destabilizzata che conferisce resistenza alla degradazione Vif-mediata. Questo dato suggerisce che una proteina con una minore stabilità potrebbe essere stata sostituita ad una più stabile per ottenere una maggiore abilità di elusione della degradazione vif-mediata [65].

In questa regione del cromosoma 22 sono individuabili circa 130 Open Reading Frame (ORF). Attraverso la stimolazione di PBMC isolati da individui HESN con antigeni di HIV-1 è stato possibile determinare che il gene maggiormente espresso è *Rac2*.

Rac2 codifica per una piccola GTPasi appartenente alla sottofamiglia Rho che funge da interruttore molecolare nella regolazione di molti meccanismi di immunità innata e adattativa [129]. E' possibile osservare tre particolari polimorfismi di questo gene tutti mappati nell'introne 5 che descrivono un aplotipo detto T (omozigote RR e eterozigote RS) e un aplotipo C (omozigote SS). L'aplotipo T è maggiormente osservabile nei soggetti HESN, mentre l'aplotipo C è più frequente nei pazienti HIV+ [Cell, submitted]

Tra i fattori endocellulari dell'ospite che modulano le fasi di replicazione virale successivi all'entrata nella cellula, è stato largamente studiato TRIM5 α , fattore antivirale che esplica la sua azione di ostacolo alla replicazione di vari retrovirus attraverso l'interazione con i capsidi virali [66]. TRIM5 α controlla i retrovirus in maniera specie-specifica, per esempio in scimmie Rhesus blocca completamente l'infezione da HIV-1. Nell'uomo è stato studiato il polimorfismo di questo gene per evidenziare

un'eventuale attività anti-HIV. In studi *in vitro*, gli alleli 136R e 43H (polimorfismo R136H e H43) correlano con la resistenza all'infezione da HIV. Al contrario, l'allele 136Q è significativamente più rappresentato in individui HIV-1+ che in HESN caucasici (questo dato non è stato però confermato da successivi studi) [67, 68]. Forse queste incongruenze sono imputabili a diversi background genetici e differenti vie di esposizione. Lo SNP 43Y è stato associato con una ridotta suscettibilità all'infezione da HIV-1 in individui asiatici, ma in esperimenti *in vitro* è stata documentata un'attività contraria [69,70]. Entrambi questi alleli sono stati studiati in una coorte indipendente composta da individui caucasici omosessuali (Coorte Amsterdam). I risultati ottenuti, mostrano una possibile associazione tra l'omozigosi di 43Y ed una rapida progressione in AIDS. Ulteriori dati indicano che la co-presenza dell'allele 136Q e degli alleli -2GG localizzati nella regione 5' UTR di TRIM5 α accelerano lo sviluppo di malattia [71]. Perciò, basandosi su questi risultati, è possibile ipotizzare che gli alleli che influenzano i livelli di espressione di TRIM5 α modulano la suscettibilità e la replicazione di HIV-1. La prossima fase consisterà nello studio di questo fenomeno in coorti di altre etnie.

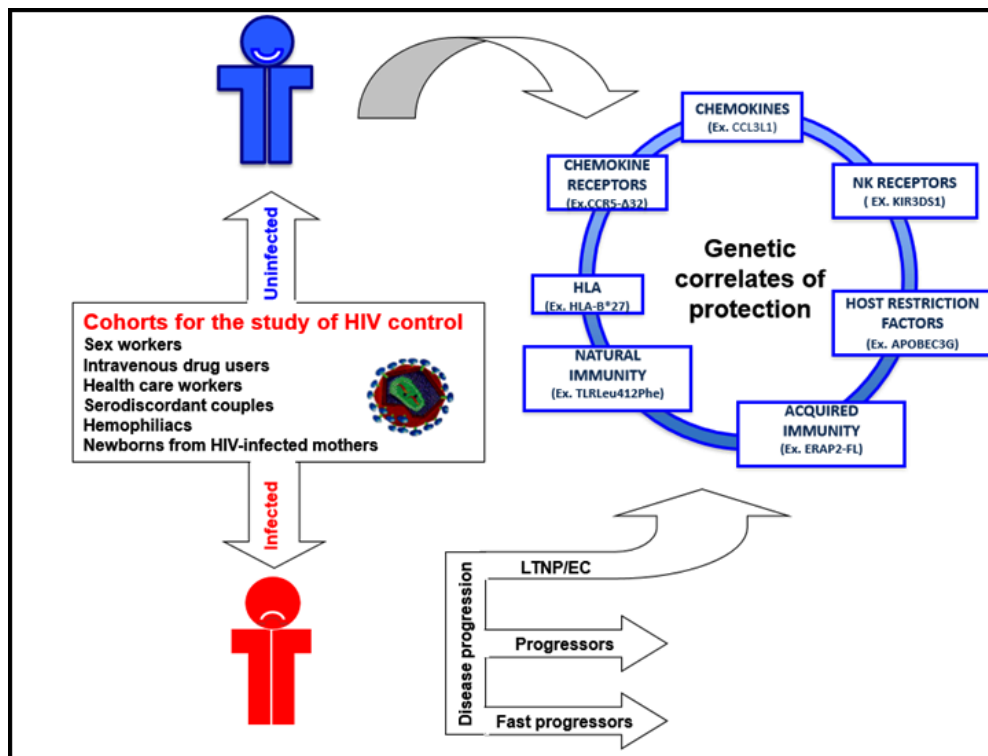
Con l'approccio del gene candidato sono stati studiati anche i polimorfismi di geni codificanti citochine, recettori citochinici e fattori coinvolti nel processo di trasduzione di segnale determinanti per la risposta immune ad HIV.

Le citochine sono molecole fondamentali per il controllo del sistema immunitario e l'eliminazione dei patogeni. Gli studi sui loro polimorfismi hanno dato molto spesso risultati contrastanti tra loro. La maggior parte dei dati ottenuti mostra un legame con la suscettibilità piuttosto che con la resistenza. In questo ambito si inseriscono gli studi sui Toll-like receptor

(TLR), una famiglia di recettori in grado di riconoscere caratteristiche stereotipate di batteri e virus. E' stato osservato che la stimolazione di PBMC con specifici agonisti di TLR3 (poly I:C), TLR4 (LPS), TLR7(imiquimod) e TLR7/8 (ssRNA40), provoca una maggiore responsività nelle cellule derivanti da HESN che in quelle di soggetti HIV+ e controlli sani [72]. L'attivazione della trasduzione di segnale di TLR negli HESN è stata recentemente associata all'aumento dell'espressione della proteina adattatrice MyD88, la quale ha un'azione inibitoria su questo processo. Inoltre studiando due coorti di individui HESN indipendenti tra loro, è stato osservato che l'allele rs3775291 (Leu412Phe) di TLR3 conferisce un fattore di protezione all'infezione da HIV [73].

Anche la proteina MX2 (myxovirus resistance 2) agisce come inibitore dell'infezione da HIV-1. Infatti, MX2 blocca la replicazione virale nella fase successiva all'entrata diminuendo l'accumulo nucleare e l'integrazione del DNA virale nascente. Le mutazioni del capsido di HIV-1 che alterano la fase di importazione nucleare utilizzata dal virus rendono nulla l'inibizione di MX2. Perciò è stato ipotizzato che MX2 abbia come bersaglio il capsido virale e che interagisca con altre proteine cellulari come Cyclofilina A che bloccano l'importazione nucleare di HIV-1 [114, 115, 116]. Attraverso studi di popolazione, è stato evidenziato un aplotipo legato a SNP rs2074560 (G/A) che negli individui HESN è maggiormente rappresentato. Anche in questo caso l'aplotipo protettivo è determinato dall'omozigosi recessiva GG. I risultati ottenuti suggeriscono che l'allele G di rs2074560 protegge da HIV-1 indipendentemente dalla via di trasmissione.

I principali alleli protettivi individuati con l'approccio del gene candidato sono riassunti nella seguente figura:



Studi di associazione Genome-wide (GWAS): risultati

Lo sviluppo di tecniche innovative di genotipizzazione ha reso possibile l'analisi simultanea di centinaia di polimorfismi dell'intero genoma. Lo studio di associazione Genome-wide (GWAS), un approccio non guidato da ipotesi, ha condotto all'identificazione di nuove associazioni tra varianti genetiche e malattie infettive ed ha confermato dati ottenuti con l'approccio del gene candidato. Lo svantaggio di questo metodo consiste nella necessità di campioni di grande dimensione per avere il necessario potere statistico per determinare le associazioni (il campione statistico significativo è un p value combinato inferiore a 5×10^{-8}) [74]. Questi studi mettono a confronto DNA di individui sani e individui che presentano una determinata patologia utilizzando tecniche bioinformatiche che individuano SNP marcatori di gruppi di variazioni geniche (aplotipi). Queste variazioni vengono considerate indicative della regione in cui

probabilmente si trova una mutazione che contribuisce allo sviluppo della patologia. La maggior parte degli SNP associati con la malattia non mappano nella regione codificante della proteina, ma si trovano nella regione regolatoria del gene o in un introne.

Nell'ambito dell'infezione da HIV-1, sono stati determinati molti GWAS associati con la carica virale, la progressione di malattia, la replicazione virale, la resistenza al virus. Nel 2007 Fellay illustrò la possibile associazione tra varianti polimorfiche e carica virale durante il periodo asintomatico dell'infezione con dati ottenuti studiando una coorte europea. I risultati mostravano alti livelli di associazione tra tre SNP (single nucleotide polymorphism) e una bassa carica virale [75].

Il primo SNP denominato rs2395029 che mappa nella regione del complesso HLA-B*5701 (HPC5) è in elevato *linkage disequilibrium* (LD) con l'allele HLA B*5701, che con l'approccio del gene candidato è stato associato con un effetto protettivo contro la progressione di malattia [76] e con una bassa carica virale [77]. Il secondo SNP denominato rs9264942 presente a monte del gene HLA-C e telomerico rispetto a HPC5, è legato alle differenze nei livelli di espressione di HLA-C [78]. Infine, il terzo chiamato rs9261174 si trova in una regione regolatoria 5' vicino al gene ZNRD1 e codifica una subunità della RNA polimerasi di tipo I. E' con molta probabilità associato alla progressione dell'infezione di HIV-1 [79]. Nel 2009 gli stessi ricercatori pubblicarono ulteriori dati che hanno confermato l'associazione tra la variazione della carica virale, la progressione dell'infezione e rs2395029 e rs9264942 [80]. Inoltre determinarono altri polimorfismi presenti nella regione HLA associati all'andamento dell'infezione, confermando una volta di più il ruolo centrale di questo locus nel controllo dell'HIV. Nel 2010 Pelak e

collaboratori con l'approccio GWAS sono riusciti ad identificare alcuni fattori di protezione dall'infezione di HIV-1 in una coorte di individui afroamericani [81]. I risultati dello studio hanno evidenziato che esiste una forte correlazione tra un SNP intronico compreso nel gene HLA-B (rs2523608) e il controllo dell'infezione. Inoltre, vennero confermati i risultati ottenuti nello studio di rs9264942. Non riuscirono però a confermare i dati relativi all'allele G di rs2395029, probabilmente perché questo allele è poco frequente nella popolazione afroamericana. Poiché entrambi i metodi di indagine descritti hanno evidenziato la centralità del ruolo di HLA, l'International HIV Controllers Study (2010) ha approfondito maggiormente la sua azione nella progressione dell'infezione da HIV [82]. In questo progetto sono stati analizzati molti SNP compresi nella regione HLA e aminoacidi della catena proteica corrispondente in una coorte multietnica di pazienti con infezione progressiva e in una di individui che controllano l'infezione per determinare quali siano i fattori genetici associati alla non-progressione dell'infezione di HIV-1 in AIDS. Inoltre vennero analizzati gli SNP presenti nelle regioni del locus che codificano per aminoacidi coinvolti nell'interazione tra peptidi virali e complesso HLA classe I. I risultati ottenuti identificarono nel complesso HLA-B quattro aminoacidi (Arg⁹⁷, Cys⁶⁷, Gly⁶² e Glu⁶³ e uno rispettivamente in HLA-A (Ser⁷⁷) e HLA-C (Met³⁰⁴) che fungono da markers di associazione con il controllo di HIV-1. Questi residui, fatta eccezione per Met³⁰⁴ che si trova nel dominio transmembranario di HLA-C, si trovano nel sito di legame peptidico di HLA classe I. Perciò è stato ipotizzato che possa esserci un legame tra questi particolari SNP e la presentazione degli epitopi classe I ristretta nell'ospite [83]. Lo stesso studio, inoltre, ha confermato il legame tra le variazioni genetiche del locus di CCR5 e CCR2 nella progressione dell'infezione in AIDS.

Nel 2011 Bol e collaboratori hanno messo appunto un innovativo GWAS che usa come substrato i macrofagi monociti-derivati (MDMs) [84]. In seguito all'infezione primaria, i macrofagi diventano un *reservoirs* per HIV-1, perciò analizzando queste cellule è possibile ottenere molte informazioni utili che consentirebbero, ad esempio, lo sviluppo di nuovi farmaci. Analizzando l'infezione *in vitro* di MDMs, i ricercatori hanno tentato di stabilire una correlazione tra SNPs e i livelli di replicazione virale. I risultati iniziali avevano indicato una forte associazione tra alcuni SNP e la replicazione virale, ma il proseguimento dello studio ha confermato l'associazione significativa solo con rs12483205SNP. Questa variante polimorfica si trova sul gene DYRK1A che a sua volta mappa sul cromosoma 21. DYRK1A è una proteina chinasi coinvolta in molti processi di regolazione di espressione genica e funzione cellulare.

GWASs ha evidenziato l'importanza che la regione HLA (soprattutto di HCP5/HLA-B*57) riveste nel controllo della replicazione virale, tuttavia Limou e collaboratori in un lavoro del 2010, studiando una coorte di LTNP, hanno evidenziato un'associazione tra la non progressione in AIDS ed un altro SNP questa volta compreso in CXCR6 e probabilmente correlato con l'espressione genica di questo locus [85]. Nonostante i molti studi compiuti, pochi SNP analizzati con l'approccio GWASs sono stati associati allo status di HESN. Petrovsky ha studiato 848 HESN e 531 HIV-1 positivi, senza trovare nessuna associazione [86]. Lingappa ha svolto uno studio simile al precedente, considerando due coorti di coppie africane sierodiscordanti, ancora una volta senza successo [87]. Più recentemente sono stati confrontati dati genotipici di individui HIV-1+ e controlli sani discendenti dalla stessa linea genealogica per capire quali siano i fattori genetici che possono contribuire all'acquisizione di HIV-1. I risultati hanno mostrato un'associazione tra rs6996198(che mappa sul cromosoma 8) e

un ridotto rischio di infezione. Questa variante è maggiormente frequente negli individui HESN e determina un aumento della trascrizione di CYP7B1, gene coinvolto nella flogosi e nella produzione di IgA [88].

GWASs ha confermato il ruolo determinante di HLA classe I e CCR5 nella patogenesi di HIV-1, ma questi dati rappresentano solo un piccolo tassello del puzzle del controllo dell'infezione. I pochi risultati ottenuti con GWASs sono dovuti a diverse problematiche, prima tra tutte la presenza di coorti HESN con pochi individui che diminuiscono la validità di questa metodica.

Interazioni tra microRNA e HIV-1:

Studi funzionali hanno dimostrato che molti dei geni coinvolti nello sviluppo di AIDS determinati con l'approccio del gene candidato e con la GWASs esplicano la loro funzione attraverso la modulazione dei loro livelli di espressione. Cambiamenti dell'espressione genica possono dipendere da specifici SNP presenti nella regione regolatoria o l'attivazione di altri meccanismi di controllo indotti dall'interazione virus-ospite: i microRNA (miRNA) fanno parte di quest'ultimo gruppo. Gli miRNA sono molecole a funzione regolatoria post-trascrizionale che intervengono nell'espressione genica inibendo la traduzione delle molecole di mRNA [89] principalmente provocando uno scorretto appaiamento delle basi con la sequenza presente nella regione 3' UTR del messaggero trascritto [90]. Questo meccanismo porta ad una successiva degradazione o repressione della traduzione dei messaggeri che sono più o meno complementari alla "regione seme"(i primi 7 nucleotidi dell'estremità 5') del miRNA [89]. La maggior parte degli miRNA sono trascritti dalla RNA polimerasi di tipo II da regioni non codificanti del genoma in lunghi trascritti primari detti pri-

miRNA [91]. I pri-miRNA sono successivamente processati nel nucleo da enzimi RNasi III- simili detti *Drosha* [92] e DGCR8 (*DiGeorge critical region 8*) in precursori di miRNA (pre-miRNA) [93]. I pre-miRNA sono trasportati da Exp-5 (esportina 5) nel citoplasma [94] dove vengono ulteriormente processati da un'altra endonucleasi RNasi-III simile detta *Dicer* in un RNA doppio di circa 22 nt formato da un filamento guida e un filamento passeggero. Il filamento guida è incorporato nel complesso induttore del silenzio (RISC) a formare il miRISC. Il legame del miRNA alla regione 3' UTR di un mRNA bersaglio attraverso la sequenza seme provoca la degradazione del messaggero o l'inibizione della traduzione [95].

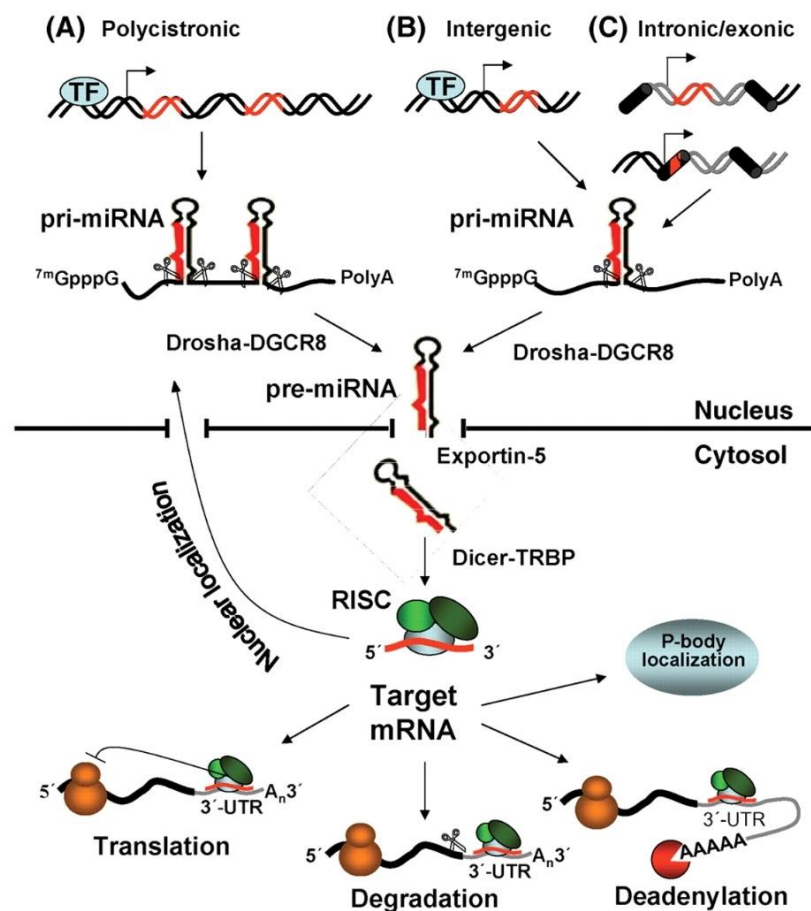


Fig.3:Meccanismo di biogenesi di miRNA.

Viene stimato che circa il 30% dei geni umani siano regolati da miRNA [96] compresi geni dell'omeostasi cellulare, dello sviluppo, della differenziazione, di proliferazione cellulare e apoptosi [97]. Sono state formulate ipotesi sul coinvolgimento di miRNA aberranti nello sviluppo di neoplasie, malattie autoimmuni, neurodegenerative, infiammatorie e nei disordini muscolari e cardiovascolari. Il possibile coinvolgimento degli miRNA nella modulazione della risposta immunitaria innata e adattativa e il suo ruolo nella modulazione dell'interazione virus-ospite è un'ipotesi recente che ha fornito dati discordanti tra loro. Nel 2007 Triboulet e collaboratori dimostrarono che il silenziamento dei geni *Dicer* e *Drosha*, che codificano per due enzimi processatori di miRNA, provoca l'aumento della replicazione di HIV-1 evidenziando una possibile influenza di miRNA sulla replicazione del virus e sull'interazione virus-ospite [98]. Altri lavori hanno però evidenziato che il virus stesso è in grado di modulare alcuni miRNA dell'ospite i quali a loro volta regolano il ciclo cellulare, l'apoptosi, l'attivazione delle cellule T, la risposta di citochine e chemiochine. Gli miRNA potrebbero influenzare il rapporto virus-ospite attraverso un meccanismo diretto sulla replicazione virale oppure attraverso un meccanismo indiretto di modulazione di geni cellulari che a loro volta influenzano la replicazione virale [99, 100]. Recentemente sono stati identificati alcuni miRNA che interagendo con geni accessori di HIV-1 ne ostacolano le fasi iniziali del ciclo vitale [101]. Tra questi miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 e miR-382 che riconoscono la regione 3'UTR del trascritto di HIV-1 e convertono un'infezione produttiva in infezione latente nei linfociti CD4+ quiescenti [102]. Questi miRNA sono presenti in elevati livelli nei linfociti T CD4+ ed è stato osservato che la trasfezione in queste cellule di molecole anti-miRNA produce un aumento della produzione di virioni. Poiché lo stato di latenza è sfruttato dal virus in vivo

per la sua sopravvivenza, si può ipotizzare che HIV-1 “recluti” gli miRNA per inibire l’espressione di antigeni virali e mantenere così lo stato di latenza. Alcuni miRNA hanno azione diretta sui messaggeri virali: tra questi miR-29a e miR-29b che inibiscono l’espressione di Nef e la replicazione di HIV. miR-29a è anche coinvolto nella repressione della replicazione virale perché contribuisce all’accumulo dei messaggeri virali nei corpi P dove i messaggeri vengono stoccati e degradati [103, 104]. In colture cellulari in mezzo MDM è stato osservato che con la differenziazione dei monociti in macrofagi e la graduale diminuzione di miR-28, miR-150, miR-223 e miR-382 varia il grado di permissività all’infezione con HIV-1, i macrofagi tissutali si dimostrano più suscettibili all’infezione da HIV-1 in vivo rispetto ai monociti del sangue periferico [105, 106]. In un recente lavoro, Houzet e colleghi mostrano come altri cinque miRNA (miR-133b, miR-138, miR-326, miR-149, miR-92a) con un putativo sito bersaglio nel genoma virale (predetto da analisi *in silico*) riducano l’infezione da HIV-1 di oltre il 40%. Inoltre, analizzando miR-326 e il suo supposto sito bersaglio nella sequenza ORF di Nef, è stata stabilita una correlazione tra la lunghezza del complesso miRNA-mRNA e l’efficacia della restrizione della replicazione di HIV-1 mi-RNA mediata [107]. Numerosi mi-RNA regolano l’espressione di proteine che fungono da cofattori virali. Per esempio, la famiglia miR-17/92 può inibire la replicazione di HIV-1 agendo sulla regione 3’UTR mRNA di PCAF (P300/CBP-associated factor), un cofattore della proteina Tat. Al contrario, HIV-1 può sopprimere l’espressione di miR-17/92 facilitando così la sua replicazione [97]. Altri due lavori hanno evidenziato che miR-198, miR-27b, miR-29b, miR-150 e miR-223 inibiscono l’espressione della ciclina T1 nei CD4+ quiescenti [108, 109]. La ciclina T1 è una delle tre subunità regolatorie di p-TEFb (positive transcription elongation factor b) che si lega alla proteina Tat consentendo una

trascrizione efficace. Un altro gruppo di sei miRNA è in grado di legarsi ad un altro cofattore di Tat, la proteina Pur- α (purine-rich element binding protein α) causando la riduzione della suscettibilità all'infezione da HIV-1 nei monociti [110].

Confrontare i profili di espressione dei vari miRNA tra cellule infette e non infette può consentire di capire come l'infezione da HIV-1 può influenzare l'azione degli miRNA [111]. Gli sforzi dei ricercatori sono adesso rivolti nel caratterizzare gli miRNA in differenti assetti cellulari e in gruppi di individui infetti o non infetti per tentare di chiarire ulteriormente il loro ruolo nella mancata suscettibilità al virus dell'HIV-1 e nella riduzione dell'efficienza della sua replicazione. Il profilo degli miRNA potrebbe infatti rivelarsi un marker capace di predire il decorso di malattia e le complicazioni associate all'infezione. A questo proposito in un lavoro pubblicato nel 2012 mostra una correlazione tra il profilo di espressione degli miRNA nei PBMC, la viremia e il numero dei CD4+ in pazienti HIV+ elite controller (EC) e individui HIV+ viremici [112]. Altri lavori mostrano un differente profilo di miRNA in CD4+ isolati da pazienti HIV+ (tutti pazienti HIV+ naive o EC) e individui HESN [113], in particolare negli individui HESN c'è una riduzione della produzione di miR-28-5p, miR-125-b, miR-223, miR-23a, miR-125a-3p e miR-155. Questi dati suggeriscono che l'esposizione al virus è in grado di modificare l'espressione degli miRNA.

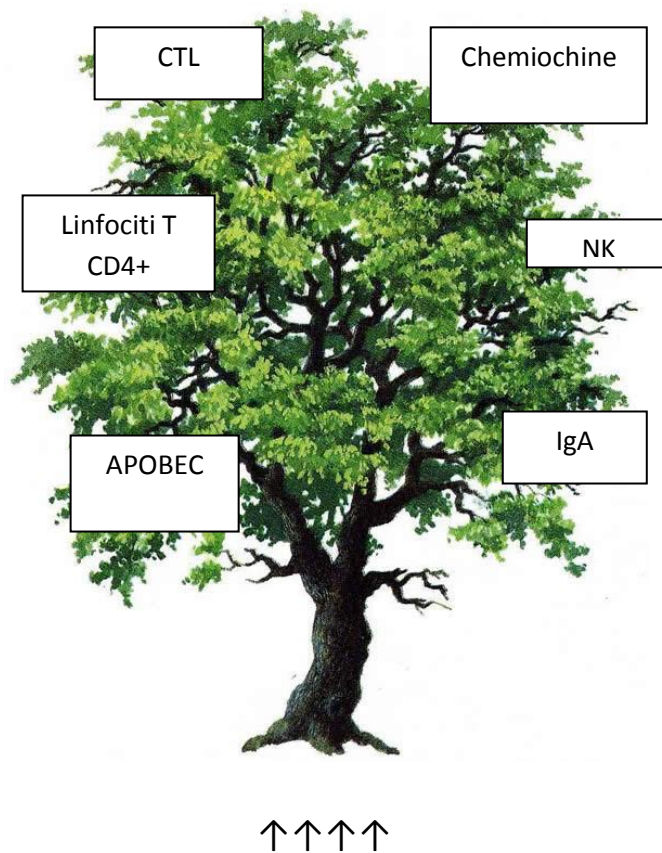
SCOPO DELLA RICERCA:

E' noto da molti anni che la patogenesi di HIV è multifattoriale ed è influenzata dal rapporto virus-ospite.

Per questo la caratterizzazione genetica del sistema immunitario dell'ospite è un punto cardinale nello studio della progressione della malattia. Questo nuovo approccio che associa ad un'azione del virus che entra in contatto con l'ospite un insieme di reazioni che il sistema immunitario allestisce in sua presenza, deriva dall'osservazione, avvenuta a partire della fine degli anni '80, di un gruppo di soggetti che risultano sieronegativi nonostante ripetute esposizioni al virus e definiti per questo "HESN" HIV-esposti sieronegativi.

La serie di indagini conseguenti a questa osservazione ha portato alla concezione di un "vantaggio immunologico" che alcuni soggetti possiedono nei confronti dell'infezione da HIV. Tale "vantaggio" è un insieme di caratteristiche genetiche proprie di questi pazienti (ad esempio la delezione del CCR5, il polimorfismo del cromosoma 22, il polimorfismo di D-Sign) che portano all'attivazione di una molteplicità di meccanismi effettori dell'immunità (APOBEC, IL-22, IgA, NK, ecc.) che consente all'individuo HESN di evitare l'instaurarsi dell'infezione e la sua cronicizzazione.

Possiamo rappresentare questo concetto come un albero che resiste alle intemperie grazie alla sua chioma: la forza dei rami dipende dalle radici dell'albero. Le radici rappresentano le caratteristiche genetiche favorevoli che vengono espresse come un'immunità, rappresentata dai rami, adatta a contrastare l'infezione (intemperie):



Delezione CCR5 - Copie di CCL31 - Polimorfismo di CCR5

Polimorfismo di SDF-1 - Polimorfismo di MLB

Polimorfismo del recettore della vitamina D - Polimorfismo di DC-SIGN Polimorfismo di IRF-1 - geni MHC - Polimorfismo cromosoma 22

In particolare, le indagini eseguite sui soggetti HESN del nostro Day-Service di Malattie Infettive presso l'Ospedale S.M. Annunziata di Firenze, hanno portato all'osservazione di un gruppo di geni (ERAP2, TLR3,

APOBEC3H, MX2, RAC2) i cui aplotipi sono legati al vantaggio immunologico dei pazienti.

La nostra ricerca si sviluppa in tre parti. La prima ha come intento quello di evidenziare un “super genotipo” risultante della combinazione delle singole caratteristiche genetiche protettive e di confrontarne la frequenza tra la coorte di pazienti HIV+ e quella di individui HESN seguiti dal nostro Day Hospital nell’ambito del progetto “Coppie Discordanti”. La seconda mira a determinare eventuali correlazioni tra ciascun aplotipo di questi geni e la progressione della malattia in soggetti HIV+, calcolando con metodi statistici l’associazione tra la presenza di un determinato genotipo con caratteristiche cliniche e di laboratorio. Nella terza parte abbiamo cercato di capire se tali correlazioni erano presenti nell’analisi dei pazienti sieropositivi divisi in gruppo a seconda del numero di alleli/aplotipi protettivi posseduti.

I soggetti HIV+ hanno contratto l’infezione perciò il loro sistema immunitario non è caratterizzato dal “vantaggio immunologico” che si osserva negli HESN, ma uno o più aplotipi considerati “resistenti” potrebbe rendere il decorso della malattia migliore rispetto a quello di un paziente con aplotipi detti “susceptibili”.

Per questo sono stati selezionati 79 pazienti HIV+ a vari stadi di infezione e sono stati genotipizzati i locus dei geni sopra descritti. In questo modo ogni paziente è stato caratterizzato geneticamente e sono stati identificati gli individui resistenti o suscettibili per uno o più locus. A questo dato sono stati poi associati dati clinici (periodo di infezione, tempo di soppressione in terapia, aderenza alla terapia, se sia attualmente in terapia, fattore di rischio) e dati di laboratorio (linfociti T CD4+ basali, linfociti T CD4+ nadir, linfociti T CD4+ all’ultimo esame ematico, viremia iniziale, viremia più

recente) per un'analisi statistica che tenta di relazionare decorso di malattia (e conseguente qualità della vita) e i vari aplotipi tentando di stabilire se esista una combinazione genetica più vantaggiosa rispetto ad un'altra. Le stesse caratteristiche sono state identificate in un gruppo di HESN per determinare la frequenza degli aplotipi protettivi e l'eventuale presenza di un "super aplotipo".

MATERIALI e METODI

Pazienti:

79 pazienti HIV+, arruolati presso il Day- Service dell'U.O.C. di Malattie Infettive dell'Ospedale S. Maria Annunziata di Firenze, sono stati sottoposti ad indagine genotipica per la ricerca di polimorfismi caratteristici di geni associati con una ridotta suscettibilità al virus ed un migliore decorso di malattia, ovvero:

- Per TLR3 gli SNP rs3775291, rs78758719
- Per APOBEC3H gli SNP rs 34522862, rs 139298, rs139299
- Per ERAP1 gli SNP rs30187, rs26618, rs30187, rs17482078, rs27044
- Per ERAP2 gli SNP rs1230361, rs2549780, rs4859315, rs2548530, rs2549782
- Per MX2 lo SNP rs2074560.
- Per RAC2 gli SNP rs2284037,rs 739042, rs739041, compresi nell'introne 5 del gene *Rac2*.

Tali pazienti hanno aderito allo studio dopo aver letto e firmato il consenso informato. Dei 79 pazienti arruolati 76 sono soggetti caucasici e 3 africani, tutti abitanti in Toscana.

I soggetti appartengono a entrambi i sessi e la fascia di età sono compresi tra i 30 e i 60 anni. Nell'ambito di questo studio sono stati arruolati anche 101 individui HESN che fanno parte della "coorte Toscana" (composta da soggetti HESN ed i rispettivi partners HIV+). I criteri di inclusione nel gruppo HESN sono i seguenti:

- 4 anni di rapporti eterosessuali non protetti con partner HIV positivi.
- Un numero di contatti sessuali annui maggiore di 8.
- Almeno tre rapporti a rischio nei quattro mesi precedenti l'arruolamento.
- Assenza di HIV genomico nel plasma e DNA provirale nei PBMC.

Così come i pazienti HIV+ anche questo gruppo è stato genotipizzato per gli stessi polimorfismi.

Questo studio che si sviluppa sull'intera storia clinica dei pazienti dal momento della contrazione dell'infezione ad oggi, comprende anche dati di 8 pazienti che sono nel frattempo deceduti per patologie AIDS correlate. Tali pazienti non sono stati esclusi perché il decorso infausto della malattia rappresenta un'informazione importante per la nostra ricerca.

Raccolta dei campioni:

Ogni paziente arruolato in questo studio è stata sottoposto ad una serie di prelievi di sangue venoso per la raccolta di circa 40 ml di campione utilizzando 6 provette da 6 ml tipo Vacutainer® addizionate con EDTA e una provetta da 6 ml senza additivi. Tali provette, immediatamente dopo il prelievo, sono state imballate in maniera appropriata e trasferite ai laboratori dell'Università degli studi di Milano a temperatura ambiente. I pazienti arruolati in questo studio vengono periodicamente sottoposti a visite di controllo presso gli ambulatori del Day-Service dell'U.O.C. di

Malattie Infettive dell'Ospedale S. M. Annunziata di Firenze ed eseguono prelievi ematici per la determinazione di vari valori indicativi del loro stato di salute. Per la ricerca della viremia vengono prelevati circa 12 ml di sangue con provetta tipo Vacutainer® con EDTA come additivo e trasportate in contenitori refrigerati nel laboratorio di biologia molecolare, per la tipizzazione linfocitaria vengono prelevati 6ml di sangue con provetta addizionata a EDTA e infine altre due aliquote vengono prelevate, centrifugate e il plasma così ottenuto viene stoccato a -80°C per eventuali ripetizioni dei test insieme a due aliquote di sangue intero; tutti gli esami vengono eseguiti nel laboratorio di analisi dello stesso ospedale.

Genotipizzazione:

Il sangue intero è stato raccolto da tutti i soggetti con venopuntura in vacutainer contenenti EDTA (Becton Dickinson, NJ, USA), e il DNA è stato estratto con il metodo fenolo cloroformio seguendo le istruzioni fornite dal fabbricante (Promega, Madison, Wisconsin, USA). I criteri di inclusione dei soggetti HESN esposti al contagio per via sessuale sono descritti in {{991 Cagliani 2010;}}.

Per la genotipizzazione delle varianti a singolo nucleotide ove possibile è stata utilizzata una strategia che prevede l'utilizzo di saggi TaqMan (Life Technologies). Ciascun TaqMan assay comprende una coppia di primers per l'amplificazione mediante PCR e due sonde allele-specifiche marcate con due distinti fluorocromi (FAM e VIC). I primers sequenza-specifici permettono l'amplificazione del frammento del DNA, mentre le sonde marcate producono un segnale fluorescente per l'amplificazione specifica di ciascun allele. L'amplificazione e la lettura della fluorescenza vengono

effettuate su uno strumento di Real-time PCR (7900 Real Time, Applied Biosystem)

La determinazione dell'allele/alleli presenti in ciascun campione viene effettuata da un software specifico che valuta i segnali fluorescenti misurati durante la lettura della piastra.

L'elenco delle varianti analizzate mediante questa strategia e il codice del saggio TaqMan utilizzato sono riportati di seguito.

L'analisi delle varianti polimorfiche mediante sequenziamento diretto, prevede una prima fase di amplificazione mediante PCR, a cui segue un trattamento enzimatico dell' amplificato con Exo-Sap al fine di eliminare i primers e i dNTPs in eccesso. Il sequenziamento del frammento di PCR mediante metodo Sanger è effettuato utilizzando la chimica BigDye[®] Terminator v3.1 (Life Technologies) ed i campioni vengono fatti correre in un sequenziatore ad elettroforesi capillare (3500 Genetic Analyser, Applied Biosystem) quindi analizzate con un programma specifico.

ERAP2:Il DNA genomico è stato utilizzato come stampo per l'amplificazione PCR usando sonde TaqMan specificamente progettate per eseguire un test di genotipizzazione di rs 2549782 di ERAP2 (TaqMan SNP test di genotipizzazione, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e usando il metodo di PCR real time di discriminazione allelica. La PCR consisteva di una prima fase a 95 ° C per 10 minuti seguiti da 40 cicli di 94 ° C per 15 secondi e 60 ° C per 1 minuto. La rivelazione di fluorescenza è svolta ad una temperatura di 60 ° C. I saggi sono stati eseguiti in 10 µl di reazione, utilizzando TaqMan Genotyping Master Mix su piastre a 96

pozzetti con uno strumento ABI 7000 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). Il codice del saggio TaqMan utilizzato è il seguente:

ERAP2 rs2549782	
Assay ID	C__3282749_20

Gli altri SNP di ERAP2 sono stati genotipizzati con sequenziamento diretto. I prodotti della PCR sono stati trattati con ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH) direttamente sequenziati su entrambi i filamenti con Big Dye Terminator Sequencing Kit (v3.1; Applied Biosystems), e fatti correre su Applied Biosystems ABI 3500 Genetic Analyzer. Le sequenze sono state assemblate utilizzando AutoAssembler version 1.4.0 (Applied Biosystems) e corrette manualmente da due differenti operatori.

ERAP2 rs1230361	
ERAP2-rs1230361-F	5'-TACAGACCTGAGTCACTGTG-3'
ERAP2-rs1230361-R	5'-CTTCCTCATGCTGGGATGAT-3'
ERAP2 rs2549780	
ERAP2-rs2549780-F	5'-CTAATTCAGTTGACTGGGCA-3'
ERAP2-rs2549780-R	5'-TGA ACTACTGCAATGACCTC-3'
ERAP2 rs4869315	
ERAP2-rs4869315-F	5'-TCGTCACCACAATAATGAGC-3'
ERAP2-rs4869315-R	5'-TCAGCACTTGACTGCATCTC-3'

ERAP2 rs2548530	
ERAP2-rs2548530-F	5'-CTTAGTGTGGACTCTCTAAG-3'
ERAP2-rs2548530-R	5'-TAGGGAAAGCTTGCAATGCA-3'

TLR3: Gli SNP rs 3775291 e rs 78758719 sono stati genotipizzati attraverso un'amplificazione con PCR e sequenziamento diretto :

TLR3-F1 rs3775291	
TLR3-F1	5'-TGGAGCACCTTAACATGGAAGA-3'
TLR3-R1	5'-GTCAGCTGCAGGTACTIONTGTG-3'
TLR3 rs78758719	
TLR3-F2	5'-AACACACTTCCAGCATCTGTCT-3'
TLR3-R2	5'-CAGCCCTCAAAGTGGATGAGA-3'

I prodotti della PCR sono stati trattati con ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH) direttamente sequenziati su entrambi i filamenti con Big Dye Terminator Sequencing Kit (v3.1; Applied Biosystems), e fatti correre su Applied Biosystems ABI 3500 Genetic Analyzer. Le sequenze sono state assemblate utilizzando AutoAssembler version 1.4.0 (Applied Biosystems) e corrette manualmente da due differenti operatori.

MX2: rs2074560 è stato genotipizzato con amplificazione in PCR e sequenziamento diretto:

MX2 rs2074560	
rs2074560-F	GCTGAACCCATTGCTGTCA
rs2074560-R	GACAAGCCATGGTTGTGAC

Gli amplificati sono stati trattati con ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH) e sequenziali direttamente su entrambi i filamenti con Big Dye Terminator sequencing Kit (v3.1 Applied Biosystems). Le sequenze sono state assemblate con AutoAssembler version 1.4.0 (Applied Biosystems) e analizzate manualmente da due operatori.

APOBEC3H: Anche i quattro SNP di interesse di questo locus sono stati genotipizzati con sequenziamento diretto con la stessa metodica utilizzata per TLR3 e MX2.

APOBEC3H rs34522862	
APOBEC3H-Fd	5'-GAAAAGTGGCTTGAGCCTGGG-3'
APOBEC3H-Rd	5'-GCAGGCACCAAGGGTTACGAA-3'
APOBEC3H rs139297 rs139298 rs139299	
APOBEC3H-Fg	5'-GTGCCATGCAGAAATTTGC-3'
APOBEC3H-Rg	5'-TGCAAAGCCTCTTTCCTAC-3'

RAC2: Anche in questo caso è stata eseguita un'amplificazione con sequenziamento diretto utilizzando primers e LA-Taq polimerasi (TAKARA BIO, Inc., Ohtsu, Japan).

RAC2-1	
Rac2-1-Fd	5'-GGGCTACCTGACGGGCAGTGTACTAGAGCAG-3'
RAC2-2	
RAC2-2 Fd	5'- AGCCTGAAGTCACTGGGATCTGACA ACTGAG -3'
RAC2-2 Rg	5'-GCTGTCTTGCTTGTAGTAGTATGTCCTCTAG-3'
RAC2-3	
RAC2-3 Fd	5'-GAGCAAGGCTAGATCCTGTTACCCAATTCAG-3'
RAC2-3 Rd	5'-TTCTAGGGCCAGGCCTCAGAGAGTTCTACAG-3'
RAC2-4	
RAC2-4 Fd	5'-CACATCAGCTGTGATTATCAGCTGGGCTCAG-3'
RAC2-4 Rd	5'-GCAGTGATTTAACTGTGCCTCAGACCCAG-3'
RAC2-5	
RAC2-5 Fd	5'-ACAGCCGTCTCTCTAGAATAGAAAGCACCAG-3'
RAC2-5 Rd	5'-CAGTGCTCTTCCCACTGTATAGAAAGCACCAG-3'

Test di screening per HIV-1:

Ogni paziente arruolato in questo studio è stato sottoposto ad uno screening per la determinazione della presenza di anticorpi anti-HIV serici. Per questo sono stati prelevati 6ml di sangue venoso in provetta senza additivi e sono stati centrifugati per ottenere il siero. I test per la ricerca di

anticorpi anti-HIV sono stati eseguiti con kit commerciali Abbott utilizzabili su strumento "Architect" della stessa ditta. I campioni di siero dei pazienti arruolati nel presente studio sono stati inseriti nella normale fase di lavoro del nostro laboratorio (routine) e per questo sottoposti alle stesse procedure operative riservate a ogni campione.

Principi della procedura:

Il saggio HIV Ag / Ab Combi Abbott Architect è un test a "sandwich" in chemiluminescenza.

Tale test utilizza microparticelle (CMIA) per la rilevazione dell'antigene p24 di HIV e anticorpi anti-HIV utilizzando come substrato siero o plasma umano. L'antigene virale p24, quando presente nel campione, si lega ad anticorpi monoclonali anti-p24 di origine murina, mentre eventuali anticorpi anti-HIV presenti nel siero del paziente si legano a proteine ricombinanti p24 di HIV-1 e HIV-2. Tali antigeni rivestono particelle paramagnetiche. Dopo una fase di lavaggio vengono aggiunti antigeni HIV ricombinanti marcati con acridinio, peptidi sintetici di HIV-1 e HIV-2 marcati e coniugati costituiti da anticorpi monoclonali murini anti-p24 anch'essi marcati. Dopo un'ulteriore fase di lavaggio vengono aggiunte una soluzione pre-Trigger (costituita da perossido di idrogeno) e una soluzione Trigger o "innescante" (costituita da idrossido di sodio).

La reazione chemiluminescente risultante è valutata in "unità di luce relativa" (RLUs) direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi anti-HIV-1 e HIV-2 e/o alla quantità di antigene p24 presente nel campione. I campioni che risultano positivi al test (valore espresso come RLU del campione su Cut-off, S/CO, considerato positivo per valori >1, negativo per valori < 0,50 con zona grigia tra 0,50 e 1), sono ultracentrifugati

(15000rpm per 4 minuti) e sottoposti nuovamente al test con l'attenzione di cambiare lo strumento utilizzato per minimizzare i rischi di un errore della strumentazione. Se il campione risulta positivo anche a questo test, si procede con la richiesta di invio al laboratorio di un secondo campione che verrà sottoposto alla stessa procedura operativa.

Sul secondo prelievo, qualora sia positivo, vengono eseguiti tre test di conferma ovvero un dosaggio western blot, un test per la determinazione e il dosaggio dell' antigene p24 di HIV-1 e un test per la rilevazione combinata delle immunoglobuline totali anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e dell'antigene p24 di HIV-1. Questi ultimi due test vengono eseguiti con la tecnica ELFA(Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Western Blot per HIV:

Questo test, che utilizza come substrato siero o plasma del paziente, viene eseguito con il kit commerciale HIV BLOT 2.2, MP Diagnostics. Tramite un dosaggio qualitativo immunoenzimatico è possibile rilevare *in vitro* anticorpi anti-HIV 1 e anti-HIV 2. Attraverso procedure di elettroforesi ed elettrotransblot vengono posti separatamente su strisce di nitrocellulosa antigeni di HIV-1 e il peptide sintetico HIV-2 specifico in modo da avere una delineazione delle risposte anticorpali a proteine virali specifiche. Sulla striscia è presente anche un controllo interno aggiuntivo del campione atto a minimizzare il rischio di false negatività dovute a errori operativi e per garantire l'avvenuta aggiunta dei campioni. Se presenti nel campione, i singoli anticorpi specifici per gli antigeni di HIV-1 o per il peptide HIV-2 specifico si legheranno a questi. Dopo una fase di lavaggio

che rimuove i componenti del campione che non si sono legati, viene visualizzata la reazione con l'aggiunta di immunoglobuline di capra anti-IgG umane coniugate a fosfatasi alcalina. La seguente aggiunta di 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato e nitroblu di tetrazolio (BCIP/NBT) substrato specifico della fosfatasi, rende le regioni della striscia positive visibili attraverso un viraggio di colore verso il blu.

La striscia di nitrocellulosa viene posta in ciascuno pozzetto dopo avere aggiunto 2 ml di soluzione di lavaggio diluita 1/20. Oltre al numero di strisce necessarie per i campioni vengono aggiunte la striscia per il controllo fortemente positivo, quella per il controllo debolmente positivo e quella per il controllo negativo. Questa fase, così come le successive, vengono eseguite in maniera automatica da uno strumento che possiede una piattaforma basculante dove è posto il vassoio di reazione in modo da sottoporre le strisce ad una continua, ma delicata oscillazione per uniformare le soluzioni che vengono di volta in volta aggiunte. Dopo avere eliminato la soluzione di lavaggio, viene aggiunta la soluzione di blotting costituita da 1g di polvere per Blot (latte scremato in polvere) sciolta in 20 ml di soluzione tampone diluita 1/10 e 20 μ l di campione. Dopo un'incubazione di un'ora a temperatura ambiente in oscillazione continua, vengono eseguiti tre lavaggi con l'apposito tampone.

Viene successivamente aggiunto il coniugato diluito 1/1000 (costituito da Ig anti-IgG umane di capra coniugate a fosfatasi alcalina) e si lascia in incubazione per altri 60 minuti al termine dei quali, dopo avere rimosso il coniugato, le strisce vengono nuovamente lavate. Infine viene aggiunto il substrato e lasciato agire per 15 minuti. Al termine di questa fase e dopo un ulteriore ciclo di lavaggi, le strisce vengono asciugate e analizzate per

l'interpretazione dei risultati che viene eseguita secondo le indicazioni della Ditta manifattrice.

Rilevazione combinata delle Ig totali anti-HIV-1 e anti-HIV-2 e dell'Ag p-24 di HIV-1 con ELFA:

Questo saggio viene eseguito in maniera completamente automatizzata tramite Vidas® HIV DUO Ultra, Biomerieux. Il principio del dosaggio associa due reazioni immuno-enzimatiche a due rivelazioni finali in fluorescenza (ELFA). Tale test viene eseguito dallo strumento attraverso l'inserimento di appositi coni costruiti in maniera tale da avere una separazione spaziale per due reazioni che avvengono simultaneamente. Nella parte alta sono fissati anticorpi monoclonali anti-p24 per la rilevazione di Ag p24. La base del cono invece permette la rilevazione di anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2, essendo rivestita di proteine gp160 di HIV-1, peptidi sintetici di HIV-1 gruppo O e HIV-2. Il kit è corredato da cartucce ciascuna composta da 10 pozzetti che contengono i diversi reattivi necessari per l'analisi. L'ultimo pozzetto è una cuvetta ottica che consente la lettura in fluorimetria. Durante una prima incubazione, il campione e l'anticorpo di coniglio anti-p24 biotinilato, presente nella cartuccia, sono aspirati e rilasciati dal cono. Grazie alla lisi del virus, la p24 viene liberata e può complessarsi agli anticorpi specifici adesi al cono e riconosciuti da quelli biotinilati. Contemporaneamente, gli anticorpi anti-HIV-1 e/o anti-HIV-2 si fissano alla gp160 e/o ai peptidi presenti nella parte inferiore del cono. Dopo una fase di lavaggio vengono aggiunti antigeni biotinilati nella parte bassa del cono in modo da potersi unire agli eventuali anticorpi specifici presenti nel

campione che si sono uniti agli antigeni fissati alla base dello stesso. Segue un terzo lavaggio e la successiva aggiunta di streptavidina marcata con fosfatasi alcalina. La streptavidina si complessa agli anticorpi anti-p24 biotinilati se presenti all'apice del cono e agli antigeni biotinilati eventualmente presenti alla base. A un ulteriore lavaggio segue la fase di rilevazione con l'aggiunta del substrato: 4-Metil-umbellifosfato che viene idrolizzato dall'enzima in 4-metil-umbelliferone, composto fluorescente. L'intensità di fluorescenza emessa a una luce di 450nm è proporzionale alla presenza di anticorpi anti-HIV e/o all'antigene p24 presente nel campione. Il valore di ogni campione viene calcolato tramite il rapporto RFV campione/ RFV standard, dove RFV è il valore relativo di fluorescenza calcolato come differenza tra la fluorescenza presente nel cono come rumore di fondo prima dell'aggiunta del substrato e quella rilevata dopo l'unione di questo. Per valori inferiori a 0,25 il test viene considerato negativo, per valori superiori a 0,25 positivo.

Test quantitativo per la ricerca di p24:

Questa determinazione viene eseguita con kit VIDAS® HIV P24 II (bioMérieux) e lo strumento VIDAS mediante la tecnica ELFA.

Il test si basa su un metodo immunoenzimatico sandwich in due fasi e una rivelazione finale di fluorescenza (ELFA). Anche in questo caso, il kit è dotato di coni sensibilizzati con anticorpi monoclonali anti-24 e di cartucce costituite da pozzetti intermedi contenenti i reattivi per l'analisi e da una cuvetta ottica finale per la lettura in fluorimetria. L'antigene p24 eventualmente presente nel campione di siero si lega agli anticorpi anti-

p24 fissati sul cono mentre i componenti non fissati vengono rimossi con un primo lavaggio. Segue una seconda incubazione durante la quale l'antigene p24 catturato dalla fase solida del cono complessa con anticorpi anti-p24 biotinilati. Dopo una serie di lavaggi, il complesso è marcato con streptavidina coniugata a fosfatasi alcalina che idrolizzando il substrato specifico(4-Metil-umbrelliferil fosfato) produce un composto fluorescente(4-Metil-umbrelliferone) la cui intensità è misurata nella cuvetta della cartuccia con una luce di lunghezza d'onda pari a 450nm. Il valore del segnale è proporzionale alla quantità di antigene p24 presente nel campione. L'interpretazione dei risultati può essere riassunta nella seguente tabella:

TITOLO	INTERPRETAZIONE
<3,0pg/ml di Ag p24	Negativo
>3,0pg/ml <5pg/ml di Ag p24	Dubbio
>5pg/ml di Ag p24	Positivo

Determinazione della viremia:

I pazienti arruolati in questo studio vengono sottoposti a visite periodiche effettuate dai medici infettivologi dell'U.O.C. di Malattie Infettive dell'Ospedale S. Maria Annunziata di Firenze e sono accompagnate da prelievi ematici per la rilevazione di vari fattori come la tipizzazione linfocitaria e la viremia. Tali determinazioni rientrano nelle normali mansioni del laboratorio di sierologia e biologia molecolare dello stesso ospedale e perciò sono comprese nelle stesse procedure operative che vengono utilizzate per tutti i campioni di plasma inviati a tali laboratori dai

vari distretti e reparti ospedalieri .I prelievi di sangue venoso si eseguono con provette Vacutainer® con EDTA e vengono centrifugati a 2500rpm per 20 minuti in modo da prelevarne il plasma.

Per la ricerca e la quantificazione della viremia viene utilizzato il test COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 versione 2.0(Roche). Questo test prevede tre fasi: una prima fase di preparazione dei campioni per isolare l'RNA dell'HIV-1, una seconda fase di trascrizione inversa dell'RNA bersaglio per generare un DNA complementare che nella terza fase servirà da stampo per l'amplificazione. Nella fase di amplificazione viene inserita nelle catene di nuova generazione una sonda oligonucleotidica segmentata a doppia etichetta specifica per l'acido nucleico bersaglio che permette la quantificazione dell'amplificato. L'intera metodica viene eseguita in maniera completamente automatica grazie al campionatore Roche p630 e allo strumento COBAS® Ampliprep e COBAS® TaqMan®. La quantificazione dell'RNA virale avviene con l'ausilio del QS (standard di quantificazione) di HIV-1 che viene amplificato contemporaneamente al campione grazie a primers e sonde specifici contenuti nella stessa master mix. Le sonde e i primers per i campioni sono diverse da quelle per il QS, in questa maniera l'identificazione dell'amplicon di HIV-1 e dell'amplicon di QS sono indipendenti. Il Qs viene aggiunto ad ogni campione e viene sottoposto alle stesse fasi di reazione. L'analizzatore calcola la concentrazione dell'RNA di HIV-1 confrontando il segnale di quest'ultimo con il segnale emesso da QS.

Preparazione dei campioni: La preparazione automatizzata dei campioni utilizza la tecnica della cattura su silice. Vengono prelevati 850µl di plasma ai quali viene aggiunto un tampone di lisi che è in grado di rompere i

virioni e liberare acido nucleico. Il tutto si svolge ad alta temperatura. Viene quindi aggiunto ad ogni campione il QS in quantità nota, proteasi e le particelle di silice magnetizzate. Durante l'incubazione l'RNA virale e del QS si legano alle particelle magnetizzate e le impurità vengono eliminate con una serie di lavaggi. Gli acidi nucleici adsorbiti vengono successivamente eluiti ed uniti alla miscela di amplificazione.

Trascrizione inversa e amplificazione: La reazione di trascrizione inversa e amplificazione mediante PCR utilizza l'enzima ricombinante termostabile *Thermus species* (Z05) che in condizione appropriate svolge contemporaneamente entrambe le attività. La miscela di amplificazione contiene l'enzima Z05, ioni Mn^{2+} , un eccesso di dNTP. Alla fase di trascrizione inversa, segue quella di amplificazione che viene ripetuta per un numero di cicli preimpostato dalla ditta costruttrice sulla macchina.

Rilevazione dei prodotti della PCR: Questa metodica di PCR Real Time utilizza sonde fluorescenti a doppia etichetta così da rilevare l'accumulo dei prodotti di amplificazione con la rilevazione dell'emissione della fluorescenza da parte del reporter. Le sonde infatti sono costituite da una regione reporter e una regione quencher. La sonda integra non emette fluorescenza per l'effetto quenching. Questo fenomeno viene meno quando la sonda per effetto della polimerizzazione viene frammentata e l'intensità di emissione segue un andamento esponenziale descrivibile con una curva di crescita. La quantificazione si basa sul principio che maggiore è il titolo dell'HIV-1 di un campione, maggiore la rapidità con la quale si raggiunge il livello di fluorescenza di riferimento. La curva di crescita del QS è costante. Le emissioni di fluorescenza rilevate per ogni campione vengono normalizzate dallo strumento al valore soglia (Ct) e convertite in

numero di copie su ml. Il test quantifica rna virale compreso tra 20 e 10^6 copie/ml.

Tipizzazione Linfocitaria:

La tipizzazione linfocitaria viene ottenuta con citofluorimetria in presenza di anticorpi monoclonali. Tale test è eseguito con il citofluorimetro COULTER® EPICS® XL™ (Beckman).

Questo metodo si basa sulla capacità di un anticorpo monoclonale di legarsi a determinanti antigenici diversi che si trovano sulla superficie cellulare. Tale legame ottenuto con incubazione del sangue intero con l'anticorpo è rilevabile con una emissione di fluorescenza da parte dell'anticorpo. Tale emissione è registrata dallo strumento e convertita in una quantità assoluta e percentuale. Gli anticorpi monoclonali utilizzati sono di origine murina e fanno parte dei reagenti CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 e CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5. Gli anticorpi sono marcati con fluorocromi diversi e sono specifici per determinanti e antigeni di superficie:

CD45 o antigene comune leucocitario (LAC) presente su ogni tipo di cellula emopoietica tranne globuli rossi maturi [114,115].

CD3: antigene di superficie presente su timociti maturi, linfociti T a riposo e maturi attivi nel sangue periferico sia induttori (helper) che soppressori/citotossici [116,117,118].

CD4: antigene espresso sui timociti e sui linfociti helper presenti nel sangue periferico [119,120].

CD8: antigene presente sul 30-35% dei linfociti maturi del sangue periferico che rivestono il ruolo di linfociti citotossici [121,122,123].

CD19: antigene presente su tutte le cellule B comprese le progenitrici precoci [124].

CD56: antigene espresso dalla popolazione NK(CD3-/CD56+) e da una minoranza di cellule T (CD3+/CD56+) [125,126,127].

La lisi dei globuli rossi viene eseguita con il reagente COULTER Immunoprep™ e con le stazioni di lavoro Q-PREP™, MULTI-Q-PREP™ o TQ-Prep™.

L'analisi dei globuli bianchi è resa possibile dal software SYSTEM II e tetraONE SYSTEM e dagli anticorpi monoclonali. Vengono inseriti nella procedura i controlli di qualità che consistono in soluzioni che riproducono la composizione del sangue periferico in globuli rossi e bianchi in quantità note.

Il sangue periferico viene raccolto in provette tipo Vacutainer con EDTA. Per ogni campione vengono preparate due provette una contenente 10µl della miscela di anticorpi CYTO-STAT tetraCHROME CD45/CD4/CD8/CD3 e una contenente 10 µl della miscela CYTO-STAT tetraCHROME CD45/CD56/CD19/CD3. Ad ognuna delle due provette vengono successivamente uniti 100 µl di sangue. Dopo un incubazione di circa 10 minuti vengono aggiunti 100 µl di Flow Counts Fluorospheres, che sono necessarie per il conteggio assoluto delle cellule. Le provette vengono quindi inserite nel citofluorimetro per la tipizzazione e il conteggio. I rimanenti globuli bianchi vengono analizzati tramite citometria di flusso impostando i gate sui linfociti.

Nel primo istogramma di ogni reagente, il gate sui linfociti viene identificato sulla base dell'intensa fluorescenza CD45+ FITC e del basso "side scatter" (diffusione laterale) (SS).

Per CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 vengono utilizzati ulteriori istogrammi per determinare la percentuale di cellule marcate positivamente: CD3+ (solo fluorescenza PC5 positiva), CD3+/CD4+ (fluorescenza PC5/RD1 positiva), CD3+/CD8+ (fluorescenza PC5/ECD positiva), CD4+/CD8- (solo fluorescenza RD1 positiva) e CD4-/CD8+ (solo fluorescenza ECD positiva).

Per CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 vengono utilizzati ulteriori istogrammi per determinare la percentuale di cellule colorate positivamente: CD3+ (solo fluorescenza PC5 positiva), CD3-/CD56+ (solo fluorescenza RD1 positiva), CD3+/CD56+ (fluorescenza PC5/RD1 positiva), CD3-/CD19+ (solo fluorescenza ECD positiva).

Il software tetraONE SYSTEM o il software tetraCXP SYSTEM insieme agli anticorpi monoclonali CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 e CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5, consentono l'analisi automatizzata delle sottopopolazioni di linfociti.

Il conteggio assoluto viene calcolato dal software con la seguente formula:

$$\text{Conteggio assoluto (cellule}/\mu\text{L)} = (\text{Conteggio delle cellule interessate colorate positivamente} \div \text{Conteggio delle Flow-Count Fluorospheres}) \times \text{Concentrazione calibrata delle Flow-Count Fluorospheres (cellule}/\mu\text{L)}$$

Raccolta dei dati clinici:

Dei pazienti HIV+ arruolati sono state analizzate alcune caratteristiche attraverso la consultazione della cartella clinica e dei dati che vengono periodicamente raccolti e inseriti in un apposito database (NetCare, Healthware Technology s.r.l., Salerno) così da poter crociare questi dati con le caratteristiche genetiche di ogni soggetto. Di ogni paziente sono state considerati:

1. Genotipo risultante dall'analisi descritta nel paragrafo "Genotipizzazione".
2. Sesso
3. Da quanti anni è infetto il paziente: in questo caso descrivendo come: 1 un'infezione contratta meno di 5 anni fa, come 2 un'infezione databile tra 5 e 10 anni e come 3 un'infezione contratta da più di 10 anni.
4. Il valore dei linfociti T CD4+ basale ovvero al momento della sierconversione o al momento del primo test di screening positivo.
5. Ultimo valore dei linfociti T CD4+: è stato inserito il valore relativo all'ultimo controllo ematico effettuato dal paziente.
6. Nadir linfociti T CD4+: valore più basso evidenziato durante la storia clinica del paziente.
7. Paziente che attualmente possiede un numero di linfociti T CD4+ >500 num/mm³: viene indicato con 1 un valore superiore o uguale a 500, con 2 un valore inferiore.
8. Viremia basale: valore della viremia rilevato con ricerca tramite amplificazione di acidi nucleici virali nel sangue in conseguenza del test di screening positivo. I valori sono da intendersi come copie/ml (quando non disponibile si indica nd).

9. Presenza o meno di viremia all'ultimo controllo ematico: viene indicato con 1 l'assenza, con 2 la presenza.
10. Tempo necessario alla soppressione della viremia: con questo parametro si intende valutare il tempo necessario a ciascun paziente per sopprimere la viremia con la somministrazione di HAART. Viene indicato con 1 la soppressione che avviene entro i 3 mesi dall'inizio della terapia, con 2 la soppressione che avviene in tempi maggiori (quando non disponibile si indica nd, quando naive si indica 0).
11. Evoluzione clinica: in questo campo viene evidenziata l'eventuale comparsa di patologie o tumori AIDS-correlati. Viene indicato con 1 l'assenza di tali eventi, con 2 la loro diagnosi.
12. Aderenza alla terapia: viene indicata con 1 un'aderenza maggiore al 75% con 2 un'aderenza inferiore al 75%.
13. Fattore di rischio: viene descritto in questo campo il fattore di rischio che ha portato il paziente a contrarre il virus HIV.
14. Assunzione di terapia HAART : viene indicato con 1 l'attuale assunzione di terapia antiretrovirale, con 2 la mancata assunzione, 0 paziente naive.
15. Anni di terapia HAART: vengono indicati gli anni di terapia.

I dati così raccolti sono stati elaborati con metodi statistici (studio delle bivariate e delle univariate) per capire se possa esserci una correlazione tra genotipo e progressione clinica dell'infezione (vedi "risultati").

Risultati:

La nostra ricerca si è sviluppata in tre fasi:

1. Un primo confronto tra le frequenze della presenza di alleli o aplotipi protettivi nella coorte di 101 HESN e in quella dei pazienti 79 HIV+.
2. Studio delle bivariate e delle univariate per ogni singolo gene e aplotipo della coorte dei sieropositivi.
3. Creazione e confronto di quattro sottogruppi compresi nella coorte HIV+ così determinati:
 - Soggetti con 4 alleli/aplotipi protettivi (indicati con "4+")
 - Soggetti con 3 alleli/aplotipi protettivi (indicati con "3+")
 - Soggetti con 2 alleli/aplotipi protettivi (indicati con "2+")
 - Soggetti con uno o nessuno allele/aplotipo protettivo (indicati con "1+").

La genotipizzazione dei locus è stata eseguita dal Dipartimento di Scienze Biochimiche e Cliniche dell'Università di Milano in collaborazione con l'Istituto Medea, dipartimento di Bioinformatica. I pazienti arruolati così come i soggetti HESN vengono seguiti presso il nostro Day Service delle Malattie Infettive, Ospedale S.M. Annunziata di Firenze. Per il rispetto della privacy ogni paziente è stato identificato con un codice composto da un numero e dalla sigla "ESN" nel caso di un soggetto esposto sieronegativo e "HIV" qualora fosse un paziente sieropositivo.

I dati ottenuti sono stati raggruppati così come segue :

GENOTIPIZZAZIONE HESN:

	TLR3	TLR3	APOBEC3H				ERAP2					MX2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560
1ESN	CT	CC	AA	GC	AG	GC	CA	GA	GA	CC	TT	GG
2ESN	CT	CC	AT	GC	AG	GC	CA	GA	GG	00	GT	AA
3ESN	CC	CC	00	00	00	00	AA	AA	AA	CC	TT	GG
4ESN	CC	CC	00	00	00	00	CA	GA	GG	TC	GG	00
5ESN	CC	CC	AT	GC	AG	GC	CC	GG	GG	TC	GG	AG
6ESN	CC	CC	AT	00	00	00	CC	GG	GG	TC	GG	GG
7ESN	CC	CC	AT	GC	AG	GC	CC	GG	GG	TT	GG	AG
8ESN	CT	CC	00	00	00	00	CA	GA	GG	00	GT	00
9ESN	CC	CC	00	00	00	00	CC	GG	GG	TT	GG	00
10ESN	TT	CC	AA	GC	AG	GC	CA	GA	GA	CC	TT	AA
11ESN	TT	CC	00	00	00	00	AA	AA	GA	CC	TT	AG
12ESN	CT	CC	00	00	00	00	CC	GG	GG	TT	GG	00
13ESN	CC	CC	AA	GC	AG	GC	AA	AA	00	CC	TT	GA
14ESN	00	00	00	00	00	00	CA	GG	AA	CC	TT	00
15ESN	CT	CC	00	00	00	00	AA	AA	AA	CC	GT	AG
16ESN	CT	CC	AA	GG	AA	GG	CC	GG	GG	TT	GG	AG

	TLR3	TLR3	APOBEC3H				ERAP2					MX2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560
17ESN	CC	CC	AT	GC	AG	GC	AA	GG	AA	00	TT	AG
18ESN	TT	CC	AT	GC	AG	GC	CA	GA	GA	CC	TT	GA
19ESN	CC	CC	00	00	00	00	CA	GA	GA	TC	GT	00
20ESN	CT	CC	AA	GG	AA	GG	CA	GA	GG	00	GT	AA
70ESN	TT	CC	TT	CC	GG	CC	CC	GG	GG	TT	GG	GA
71ESN	CC	CC	AA	GG	AA	GG	CC	GG	GG	TC	GG	AA
72ESN	CT	CC	00	00	00	00	AA	AA	AA	CC	TT	00
73ESN	CC	CC	AA	GG	AA	GG	CA	GA	GG	TC	GT	AA
75ESN	CT	CC	AA	GG	AA	GG	CA	GA	GA	TT	GT	AG
76ESN	CC	CC	AA	GG	AA	GG	CA	GA	GG	CC	GT	AA
77ESN	CC	CC	00	00	00	00	CC	GG	GG	TC	GG	00
78ESN	CT	CC	TT	CC	GG	CC	AA	AA	GA	TC	GG	AA
79ESN	CC	CC	AT	GC	AG	GC	CC	GG	GG	00	GG	AA
80ESN	CT	CC	AA	GG	AA	GG	CC	GG	GG	TC	GT	AA
81ESN	CT	CC	00	00	00	00	CC	GG	GG	TT	GG	00
82ESN	CC	CC	00	00	00	00	AA	AA	AA	CC	GT	00
83ESN	CC	CC	AA	GG	AA	GG	CC	GG	GG	TT	GG	00

	TLR3	TLR3	APOBEC3H				ERAP2					MX2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560
84ESN	CT	CC	00	00	00	00	CA	GA	GA	CC	GG	00
86ESN	CT	CC	00	00	00	00	AA	GA	AA	CC	TT	00
87ESN	CC	CC	AA	GG	AA	GG	CA	GA	GA	TC	GT	GA
88ESN	TT	CC	AT	CC	GG	CC	CA	GA	GG	TC	GT	AA
89ESN	CC	CC	AA	GG	AA	GG	CA	GA	GA	TC	GT	GG
90ESN	TT	CC	AA	GC	AG	GC	CA	GA	GA	CC	GT	AG
91ESN	CT	CC	AA	GC	AG	GC	CA	GA	GA	CC	GT	GA
92ESN	CC	00	00	00	00	00	CA	GA	GA	CC	GG	00
93ESN	CC	00	AA	GG	AA	GG	CC	GG	GG	TT	GG	AA
94ESN	TT	00	AA	GG	AA	GG	CA	GA	GA	TC	GT	AA
95ESN	CC	00	AA	GG	AA	GG	CA	GA	GG	00	GT	00
96ESN	CT	00	AA	GG	AA	GG	CA	GA	GA	TC	GT	AA
97ESN	CT	00	00	00	00	00	AA	AA	GA	CC	TT	AA
98ESN	CC	00	00	00	00	00	CA	AA	AA	CC	TT	AA
99ESN	CT	00	00	00	00	00	AA	AA	AA	CC	TT	GG
100ESN	CT	00	00	00	00	00	CA	GA	GG	TC	GG	AA
170ESN	CC	00	00	00	00	00	AA	AA	AA	CC	GT	00

	TLR3	TLR3	APOBEC3H				ERAP2					MX2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560
206ESN	CT	00	AT	GC	AG	GC	CA	GA	GA	CC	GG	AA
207ESN	CC	00	00	00	00	00	CA	GA	GA	TC	GT	00
208ESN	CT	00	AA	GG	AA	GG	CA	GA	GA	TC	GT	AG
209ESN	CT	00	AT	GC	AG	GC	CC	GG	GG	TT	GG	AA
210ESN	CC	00	00	00	00	00	CC	GG	GG	TT	GG	AA
211ESN	CT	00	00	00	00	00	CA	GA	GA	TC	GT	00
212ESN	CC	00	AA	GG	AA	GG	CC	GG	GG	TT	GG	AG
213ESN	CT	00	00	00	00	00	AA	AA	AA	CC	TT	00
214ESN	TT	00	AA	GG	AA	GG	00	00	00	00	00	GA
215ESN	CT	00	AA	GC	AG	GC	00	00	00	00	00	GG
216ESN	CT	00	AT	GC	AG	GC	00	00	00	00	00	AA
217ESN	CT	00	AT	GC	AG	GC	00	00	00	00	00	AA
218ESN	CT	00	AA	GG	AA	GG	00	00	00	00	00	AG
219ESN	CT	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AG
231ESN	CC	00	AT	CC	GG	CC	00	00	00	00	00	00
232ESN	CC	00	AT	GC	AG	GC	00	00	00	00	00	AG

	TLR3	TLR3	APOBEC3H				ERAP2					MX2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560
233ESN	CT	00	AA	GG	AA	GG	00	00	00	00	00	AA
234ESN	00	00	AA	GG	AA	GG	00	00	00	00	00	AA
239ESN	00	00	AA	GG	AA	GG	00	00	00	00	00	GA
240ESN	00	00	AT	CC	GG	CC	00	00	00	00	00	AA
241ESN	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
245ESN	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
246ESN	00	00	AA	GG	AA	GG	00	00	00	00	00	AA
247ESN	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
248ESN	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
249ESN	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00

GENOTIPIZZAZIONE PAZIENTI HIV+

	TLR3		APOBEC3H				ERAP2					MX2	Rac2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560	Hap T
22HIV	CT	CC	ETERO	GC	AG	GC	AA	AA	GA	CC	TT	AA	SS
23HIV	00	CC	WT	CC	GG	CC	AA	AA	AA	CC	TT	GG	SS
26HIV	CT	CC	ETERO	GC	AG	GC	AA	GA	GA	TC	GT	AA	00
27HIV	CC	CC	WT	GG	AA	GG	CA	GA	GG	TC	GT	00	00
28HIV	CT	00	00	00	00	00	00	GA	GA	CC	00	00	00
29HIV	CC	CC	ETERO	GC	AG	GC	AA	AA	GA	CC	GT	AG	00
30HIV	CC	CC	WT	GG	AA	GG	CA	GA	GA	TC	GT	AA	00
31HIV	TT	CC	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	GG	TC	GT	00	SS
32HIV	CT	CC	WT	GG	AA	GG	CC	GG	GG	TT	GG	AG	RR
33HIV	CT	00	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	GG	TC	GT	AA	RR
34HIV	CC	CC	WT	CC	GG	CC	AA	AA	AA	CC	TT	AG	RR
35HIV	CC	CC	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	GA	TC	GT	AA	RS

	TLR3		APOBEC3H				ERAP2					MX2	Rac2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560	Hap T
36HIV	00	00	ETERO	GC	AG	GC	AA	AA	AA	CC	TT	00	00
37HIV	CT	CC	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	GA	TC	GT	00	RR
39HIV	CC	00	00	00	00	00	00	GG	00	00	00	00	RS
40HIV	CT	CC	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	AA	CC	TT	AG	RS
101HIV	CC	CC	WT	GG	AA	GG	CA	GA	GG	CC	GT	AG	RS
102HIV	00	CC	WT	GC	AG	GC	AA	AA	AA	CC	TT	AG	RR
103HIV	CT	CC	ETERO	GC	AG	GC	AA	AA	AA	CC	TT	AG	RS
104HIV	CC	CC	WT	CC	GG	CC	CC	00	GA	TC	GT	AG	00
105HIV	CC	CC	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	GA	TC	GT	AG	RS
106HIV	CC	CC	WT	CC	GG	CC	CA	GG	GA	TC	GT	00	RS
107HIV	CT	CC	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	AA	CC	TT	00	00
109HIV	CC	00	DEL	CC	GG	CC	AA	AA	AA	CC	GT	00	00
110HIV	CC	00	WT	GC	AG	GC	CA	GA	GA	TC	GT	00	RS
112HIV	CC	CC	WT	GG	AA	GG	CA	GA	GA	TC	GT	00	RR

	TLR3		APOBEC3H				ERAP2					MX2	Rac2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560	Hap T
113HIV	CT	CC	ETERO	GC	AG	GC	CA	AA	GA	TC	GT	AG	RS
114HIV	CT	00	DEL	CC	GG	CC	CA	GA	GG	TC	GG	00	RS
115HIV	CC	CC	WT	CC	GG	CC	AA	AA	AA	CC	TT	00	RR
116HIV	CT	CC	WT	GC	AG	GC	AA	AA	AA	CC	TT	AG	RR
117HIV	00	CC	ETERO	GC	AG	GC	CC	GG	GA	TC	GT	00	SS
118HIV	TT	CC	ETERO	GC	AG	GC	AA	AA	GA	CC	TT	GG	RS
119HIV	CT	CC	DEL	CC	GG	CC	CC	GG	AA	CC	TT	AA	RR
120HIV	CC	CC	00	00	00	00	00	GG	GA	CC	00	00	00
122HIV	TT	00	WT	CC	GG	CC	CA	GA	AA	CC	GT	00	RR
123HIV	CT	00	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	GA	TC	GT	00	00
124HIV	CT	00	WT	GG	AA	GG	CA	GA	GG	TC	GT	AA	SS
125HIV	00	00	00	00	00	00	CA	GA	GG	TC	GT	00	00
126HIV	00	00	WT	GG	AA	GG	CC	GG	GG	TT	GG	GG	00

	TLR3		APOBEC3H				ERAP2					MX2	Rac2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560	Hap T
127HIV	00	00	DEL	CC	GG	CC	CC	GG	GG	TT	00	00	RS
130HIV	00	00	ETERO	CC	GG	CC	AA	AA	AA	CC	GT	AG	00
131HIV	00	00	DEL	CC	GG	CC	CC	GG	GG	TT	GG	AG	SS
132HIV	00	00	WT	CC	GG	CC	AA	AA	GG	CC	00	AG	00
133HIV	00	00	ETERO	GC	AG	GC	AA	AA	00	CC	00	AG	RS
134HIV	00	00	ETERO	GC	AG	GC	AA	AA	AA	CC	TT	AA	00
135HIV	00	00	ETERO	GC	AG	GC	CA	GG	GA	TC	GT	AG	00
136HIV	00	00	WT	GG	AA	GG	AA	AA	AA	CC	TT	AG	RR
137HIV	00	00	WT	GC	AG	GC	CA	GA	GA	TC	GT	AG	00
138HIV	00	00	WT	CC	GG	CC	CA	GA	00	TC	GT	00	SS
139HIV	00	00	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	GG	TT	GG	AG	00
140HIV	00	00	ETERO	00	00	00	CA	GA	GA	TC	GT	AG	RR
141HIV	00	00	ETERO	GC	AG	GC	CC	GG	GG	TT	00	AA	00

	TLR3		APOBEC3H				ERAP2					MX2	Rac2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560	Hap T
142HIV	00	00	WT	GG	AA	GG	CA	GA	AA	CC	TT	00	RS
143HIV	00	00	WT	GC	AG	GC	CC	GG	GA	TC	GT	AA	00
144HIV	00	00	WT	GC	AG	GC	CC	GG	GA	TC	GT	AA	00
145HIV	00	00	DEL	CC	GG	CC	CC	GG	GG	TT	GG	AG	00
148HIV	00	00	WT	GC	AG	GC	CC	GG	GG	TT	GG	AG	00
149HIV	00	00	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	GA	CC	TT	00	00
181HIV	00	00	WT	GC	AG	GC	CA	GA	00	CC	TT	AG	00
183HIV	00	00	WT	GG	AA	GG	CA	GA	GA	TC	GT	GG	00
185HIV	00	00	ETERO	GC	AG	GC	CA	GA	GA	TC	GG	AA	SS
191HIV	00	00	WT	GG	AA	GG	CA	GA	GA	TC	GT	AG	RS
192HIV	00	00	WT	GC	AG	GC	CC	GG	GG	TT	GG	AA	00
193HIV	00	00	ETERO	CC	GG	CC	CA	GA	00	TC	GT	AA	SS
196HIV	00	00	WT	GC	AG	GC	CC	GG	GG	TT	GG	GG	00
226HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	RS
227HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AG	00
228HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AG	00
229HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AG	00

	TLR3		APOBEC3H				ERAP2					MX2	Rac2
	rs3775291	rs78758719	rs34522862	rs139297	rs139298	rs139299	rs1230361	rs2549780	rs4859315	rs2548530	rs2549782	rs2074560	Hap T
230HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AA	00
235HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AG	00
236HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	GG	00
238HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
242HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AG	00
243HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AA	00
244HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AA	00
265HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AA	00
266HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AA	00
267HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	AA	00
268HIV	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	GG	00

1. Confronto tra le frequenze degli alleli e aplotipi protettivi della coorte di HESN e HIV+:

La genotipizzazione eseguita su entrambi le coorti ha mirato a ricercare gli alleli e gli aplotipi di quattro geni implicati nella risposta immune dell'ospite che contribuiscono alla creazione del "vantaggio immunologico" osservato nei soggetti HESN.

Tali geni sono:

-ERAP2: determinazione del polimorfismo per rs 25497882: genotipo protettivo GG, modello recessivo [39].

-MX2: determinazione del polimorfismo rs2074560: genotipo protettivo GG, modello recessivo [128].

-TLR3: determinazione del polimorfismo rs3775291: è sufficiente un allele T per avere protezione, modello dominante [73].

-APOBEC3H: determinazione dei polimorfismi rs34522862, rs 139297, rs 139298, rs 139299, l'aplotipo I (Hap I) che conferisce resistenza è formato da AA/GG/AA/GG [65].

-RAC2: determinazione dell'aplotipo T, la protezione è conferita dall'omozigosi TT [Cell, submitted]. Nella coorte di HESN sono stati determinati:

Num. ALLELI/APLOTIPI PROTETTIVI	Num. Soggetti
4 all/aplot. Prot (4+)	0
	0%
3 all/aplot. Prot (3+)	0
	0%
2 all/aplot. Prot (2+)	31
	30,70%
1 o nessuno all/aplot. Prot (1+)	70
	69,30%

Nella coorte di pazienti HIV+ sono stati determinati:

Num. ALLELI/APLOTIPI PROTETTIVI	Num. Soggetti
4 all/aplot. Prot (4+)	1
	1,26%
3 all/aplot. Prot (3+)	1
	1,26%
2 all/aplot. Prot (2+)	12
	15,20%
1 o nessuno all/aplot. Prot (1+)	65
	82,28%

2. Studio delle descrittive bivariate e delle descrittive univariate per ogni singolo gene e aplotipo della coorte dei sieropositivi:

I dati clinici e di laboratorio dei 79 pazienti HIV positivi che hanno aderito a questo studio sono stati raccolti in una tabella in modo da confrontarli e cercare di determinare un'eventuale correlazione tra i genotipi considerati e la progressione dell'infezione.

A tal fine sono stati eseguiti dei calcoli statistici che verranno in questa sezione mostrati, sia con descrittive univariate che con descrittive bivariate. Grazie alla genotipizzazione dei geni sopra descritti, ogni individuo è stato caratterizzato dal punto di vista genetico.

Successivamente sono stati inseriti i dati dei pazienti consultando il database e le cartelle cartacee presenti in reparto.

Di seguito viene illustrato lo schema generale risultante (per la legenda si rimanda alla sezione “Materiale e Metodi”).

	SEX	Fattore di Rischio	Inf HIV	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	Paz CD4>500	VL basale	VL undetec.	T soppress	Evol Clinica	Terapia HAART	Aderenza	Anni di terapia
22HIV	F	IDU	3	315	702	38	1	0	1	1	1	1	2	17
23HIV	F	EteroSex	3	509	600	329	1	31000	1	1	2	1	2	10
26HIV	F	IDU	3	134	1297	35	1	546000	1	1	2	1	2	15
27HIV	M	EteroSex	3	580	904	284	1	0	2	1	1	1	2	17
28HIV	F	IDU	3	811	154	83	2	140287	2	2	1	1	2	17
29HIV	M	IDU	3	321	373	27	2	0	1	nd	1	1	1	18
30HIV	M	EteroSex	3	249	671	82	1	386000	1	1	1	1	1	12
31HIV	F	IDU	3	353	121	121	2	1619	2	1	1	1	2	22
32HIV	F	EteroSex	3	1023	781	417	1	0	1	1	1	1	1	9
33HIV	F	IDU	3	202	927	202	1	0	1	1	2	1	1	7
34HIV	F	EteroSex	3	768	127	127	2	520	2	0	1	0	0	0
35HIV	M	IDU	3	129	136	129	2	7300	1	1	2	1	1	8
36HIV	M	EteroSex	3	191	680	191	1	419000	1	1	1	1	2	13
37HIV	M	EteroSex	3	440	713	196	1	94000	1	2	1	1	2	9
39HIV	F	IDU	3	437	807	36	1	500	2	2	1	1	1	16
40HIV	F	IDU	3	548	696	71	1	0	1	2	2	1	2	23
101HIV	F	EteroSex	3	506	779	132	1	3110	1	1	1	1	2	20
102HIV	F	IDU	3	218	671	44	1	66200	1	1	1	1	1	10
103HIV	M	IDU	3	411	450	113	2	45126	1	1	2	1	1	18
104HIV	M	HomoSex	3	0	715	377	1	0	1	1	1	1	2	11
105HIV	F	EteroSex	2	127	543	81	1	240000	2	1	1	1	2	9
106HIV	M	EteroSex	3	43	574	43	1	172000	1	1	2	1	2	14
107HIV	M	IDU	3	172	123	35	2	717179	2	2	2	1	2	20
109HIV	F	IDU	3	375	314	114	2	35000	2	1	2	1	2	23
110HIV	M	IDU	3	568	537	206	1	0	1	1	1	1	1	15
112HIV	M	HomoSex	3	232	380	194	2	20000	1	2	2	1	1	9
113HIV	M	IDU	3	453	417	14	2	22385	1	1	2	1	2	22

	SEX	Fattore di Rischio	Inf HIV	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	Paz CD4>500	VL basale	VL undetec.	T soppress	Evol Clinica	Terapia HAART	Aderenza	Anni di terapia
114HIV	M	HomoSex	3	675	1102	394	1	37112	1	2	1	1	1	15
115HIV	F	EteroSex	3	768	127	127	2	520	2	nd	1	1	2	10
116HIV	M	BiSex	2	49	630	225	1	>750000	2	1	2	1	1	13
117HIV	M	BiSex	3	689	592	526	1	292	2	0	1	0	0	0
118HIV	M	EteroSex/IDU	3	734	56	5	2	7300	2	2	2	1	1	21
119HIV	M	EteroSex	3	548	948	178	1	10501	1	1	2	1	1	22
120HIV	M	EteroSex	3	382	669	37	1	0	1	nd	1	1	1	21
122HIV	M	IDU	3	407	446	10	1	8644	1	1	2	1	1	24
123HIV	M	IDU	3	187	302	33	2	0	1	nd	2	1	2	16
124HIV	F	EteroSex	3	944	627	502	1	0	1	nd	1	1	1	7
125HIV	M	HomoSex	3	492	572	114	1	14000	2	2	1	1	1	10
126HIV	M	IDU	3	1060	442	392	2	22000	2	2	1	1	2	2
127HIV	M	EteroSex	3	59	437	20	2	210000	1	1	1	1	1	11
130HIV	M	IDU	3	603	879	350	1	0	2	2	1	1	2	17
131HIV	F	EteroSex	3	724	1018	24	1	30936	1	1	1	1	1	22
132HIV	M	BiSex	3	480	612	248	1	0	1	2	1	1	1	17
133HIV	M	IDU	3	76	940	26	1	230000	1	2	2	1	1	9
134HIV	M	EteroSex	3	180	374	6	2	0	1	nd	2	1	2	17
135HIV	F	EteroSex	2	79	579	79	1	17000	1	2	2	1	1	6
136HIV	M	EteroSex	3	638	576	272	1	0	1	1	1	1	1	17
137HIV	M	HomoSex	3	169	638	169	1	0	1	1	2	1	1	11
138HIV	M	EteroSex	2	229	622	110	1	180000	1	2	1	1	1	9
139HIV	M	EteroSex	2	411	680	242	1	0	1	1	1	1	1	7
140HIV	M	EteroSex	2	323	666	305	1	136000	2	2	1	1	2	6
141HIV	F	IDU	2	291	246	10	2	136000	2	2	1	1	1	5
142HIV	M	EteroSex	3	4	554	4	1	1000000	1	2	2	1	1	10
143HIV	M	EteroSex	1	212	501	15	1	977	1	2	1	1	1	5

	SEX	Fattore di Rischio	Inf HIV	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	Paz CD4>500	VL basale	VL undetec.	T soppress	Evol Clinica	Terapia HAART	Aderenza	Anni di terapia
144HIV	M	IDU	3	557	662	206	1	1190	2	2	1	1	2	8
145HIV	M	EteroSex	3	333	1067	257	1	0	1	1	1	1	1	17
148HIV	F	IDU	3	139	594	120	1	0	1	nd	1	1	2	17
149HIV	M	IDU	3	138	226	102	2	78698	2	2	2	1	2	15
181HIV	F	IDU	3	369	758	228	1	0	1	2	1	1	2	16
183HIV	M	EteroSex	1	39	571	39	1	804598	1	2	1	1	2	4
185HIV	F	IDU	3	716	545	222	1	0	1	1	1	1	1	23
191HIV	M	IDU	3	150	27	6	2	8192	2	2	2	1	2	15
192HIV	F	IDU	3	425	942	45	1	6995	1	1	1	1	1	14
193HIV	M	HomoSex	3	370	486	157	2	10000	1	1	1	1	1	17
196HIV	M	BiSex	2	19	553	19	1	225000	1	2	1	1	1	8
226HIV	M	EteroSex	3	794	600	150	1	6226	1	nd	2	1	1	13
227HIV	M	HomoSex	2	115	268	98	2	220000	2	2	2	1	1	9
228HIV	M	EteroSex	1	117	550	117	1	308000	1	2	1	1	1	4
229HIV	M	IDU	3	5	1099	5	1	750000	1	2	2	1	1	19
230HIV	M	EteroSex	1	209	796	209	1	19100	1	2	1	1	1	4
235HIV	M	IDU	3	192	716	192	1	152000	2	2	1	1	2	14
236HIV	M	IDU	1	99	440	99	2	0	1	nd	1	1	1	4
238HIV	M	EteroSex	1	346	561	346	1	19	1	0	1	0	0	0
242HIV	F	IDU	3	78	99	78	2	453000	2	2	1	1	1	15
243HIV	F	EteroSex	3	731	1107	50	1	134000	1	1	1	1	1	11
244HIV	M	EteroSex	1	131	476	131	2	567000	1	2	1	1	1	3
265HIV	M	EteroSex	1	903	972	629	1	0	1	nd	1	1	1	3
266HIV	M	BiSex	1	213	518	213	1	1590	1	2	2	1	1	3
267HIV	F	EteroSex	3	519	958	519	1	2400	1	2	1	1	1	9
268HIV	M	EteroSex	1	495	574	443	1	14600	2	0	1	0	0	0

Studio delle Bivariate:

I calcoli delle varie caratteristiche cliniche in funzione dei vari polimorfismi sono stati eseguiti con l'ausilio del programma di elaborazione statistica "The R Project for Statistical Computing" (GNU Project). Grazie a questo programma è stato possibile realizzare anche i relativi grafici.

TLR3 rs 3775291:

- Distribuzione del sesso per allele protettivo:

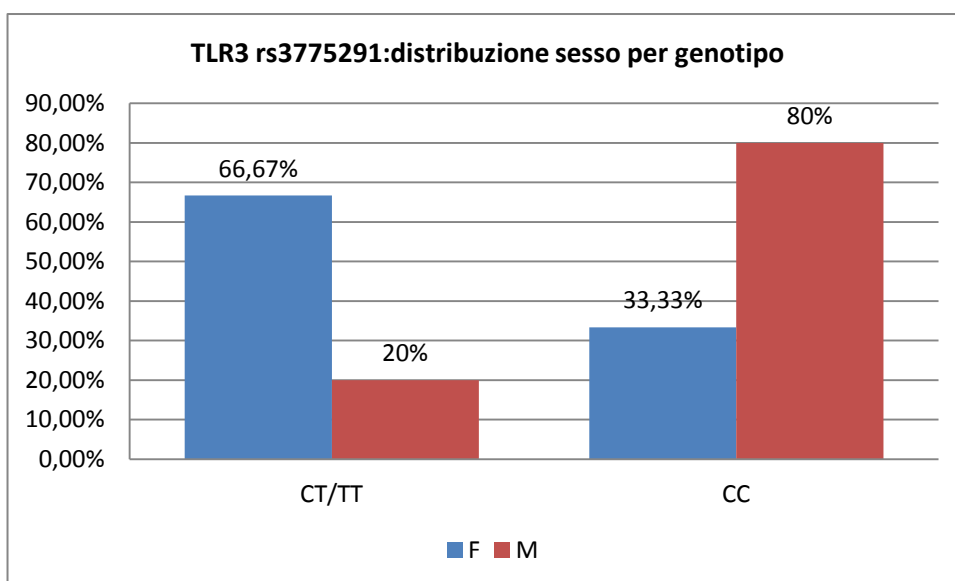
SEX	TLR3 rs 3775291		
	CT/TT	CC	tot
F	12	3	15
	66,67%	33,33%	100%
M	6	12	18
	20%	80%	100%

Chi-squared test

X-squared=7,187, df=1, p-value=0,0073

Yates' chi-squared test:5,428

Yates' p-value:0,02



- Distribuzione del fattore di rischio per allele protettivo:

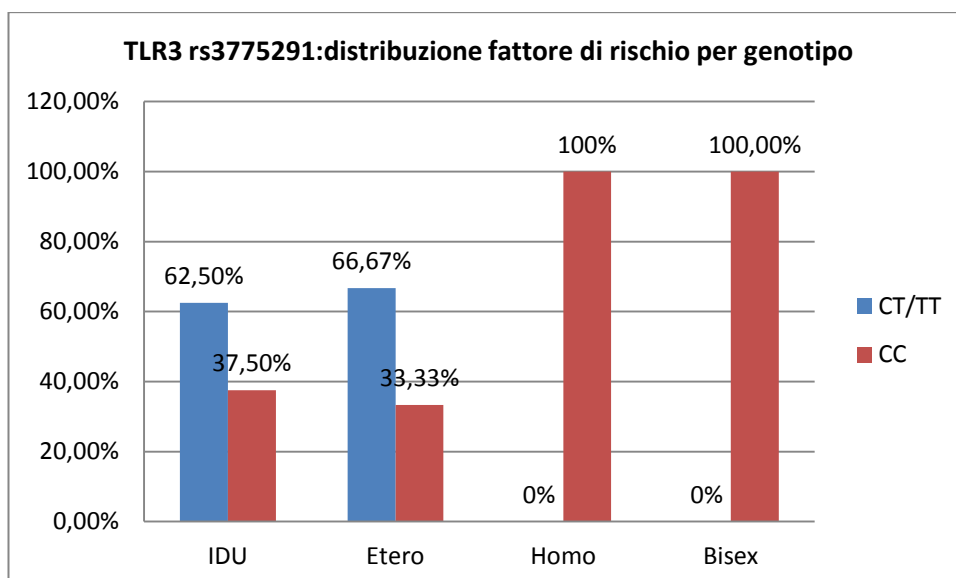
Fatt. RISCHIO	TLR3 rs 3775291		
	CT/TT	CC	tot
IDU	10	6	16
	62,5	37,5	100%
Etero	8	4	12
	66,67%	33,33%	100%
Homo	0	3	3
		100%	100%
Bisex	0	2	2
		100,00%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,259, df=2, p-value=0,878

Yates' chi-squared test:0,355

Yates' p-value:0,837



- Distribuzione del periodo di infezione da HIV per allele protettivo:

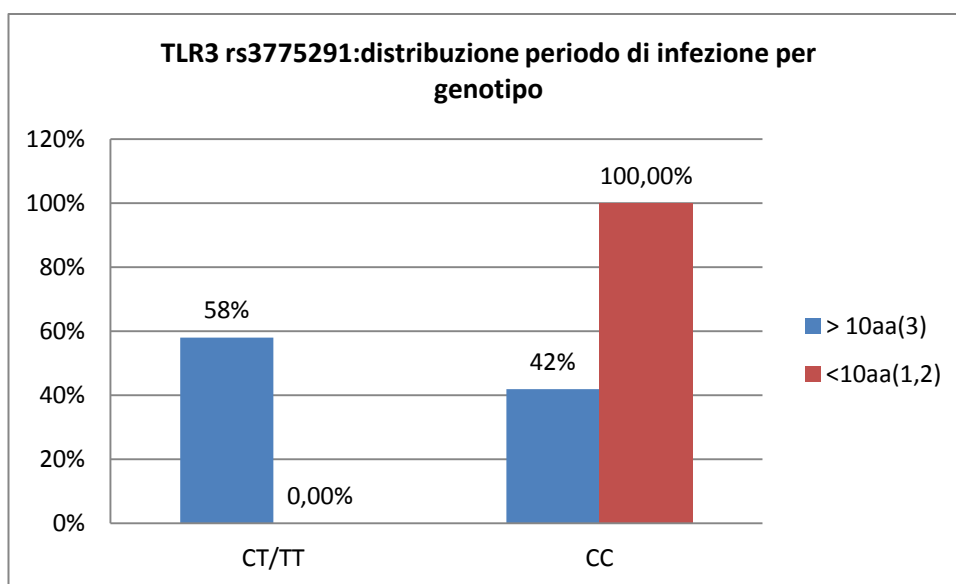
INF HIV	TLR3 rs 3775291		
	CT/TT	CC	tot
> 10aa(3)	18	13	31
	58%	42%	100%
<10aa(1,2)	0	2	2
	0,00%	100,00%	100%

Chi-squared test

X-squared=2,55, df=1, p-value=0,109

Yates' chi-squared test: 0,75

Yates' p-value: 0,386



- Distribuzione dei pazienti attualmente con linfociti CD4+ >500num/mm³ per allele protettivo:

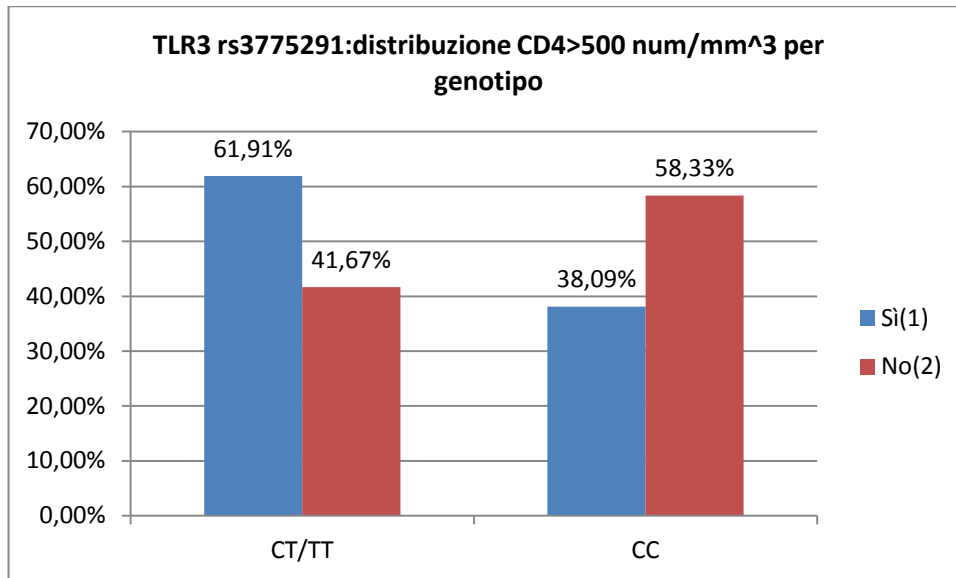
CD4>500	TLR3 rs 3775291		
	CT/TT	CC	tot
Si(1)	13	8	21
	61,91%	38,09%	100%
No(2)	5	7	12
	41,67%	58,33%	100%

Chi-squared test

X-squared=1,262, df=1, p-value=0,261

Yates' chi-squared test: 0,577

Yates' p-value: 0,447



- Distribuzione della attuale carica virale plasmatica non rilevabile (VL undetected) per allele protettivo:

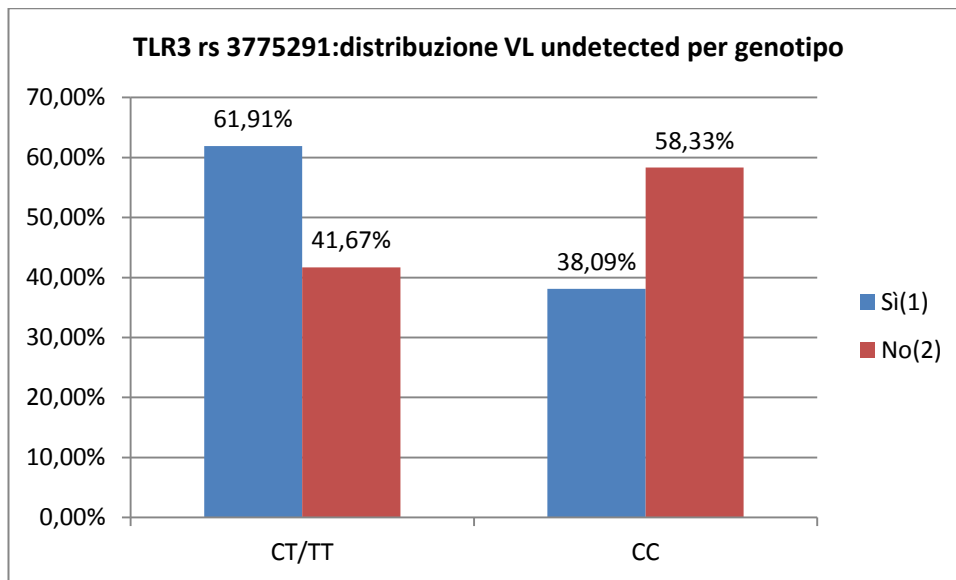
VL undetected	TLR3 rs 3775291		
	CT/TT	CC	tot
Si(1)	13	8	21
	61,91%	38,09%	100%
No(2)	5	7	12
	41,67%	58,33%	100%

Chi-squared test

X-squared=1,262, df=1, p-value=0,261

Yates' chi-squared test: 0,577

Yates' p-value: 0,447



- Distribuzione del tempo di soppressione della carica virale plasmatica in presenza di terapia per allele protettivo:

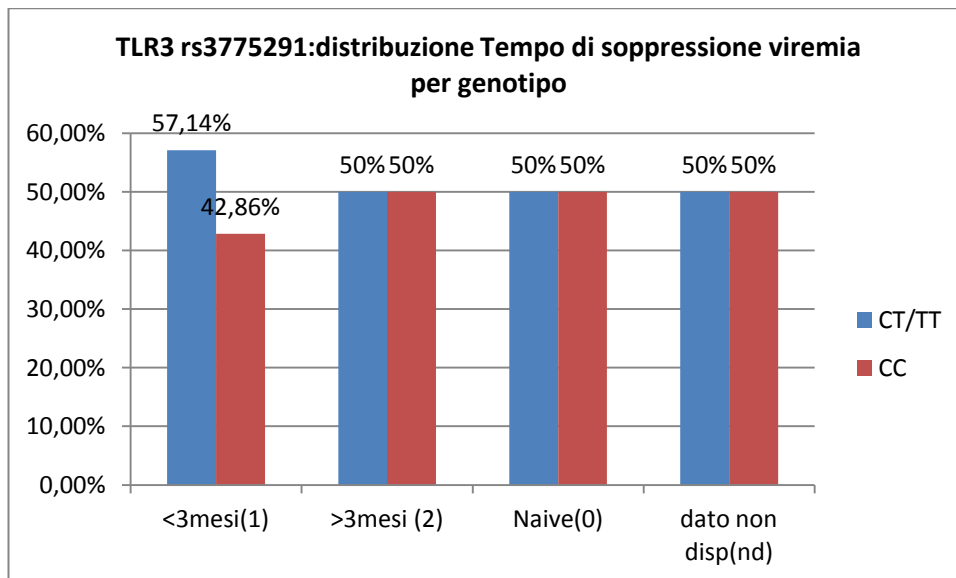
Tsoppr	TLR3 rs 3775291		
	CT/TT	CC	tot
<3mesi(1)	12	9	21
	57,14%	42,86%	100%
>3mesi (2)	4	4	8
	50%	50%	100%
Naive(0)	1	1	2
	50%	50%	100%
dato non disp(nd)	1	1	2
	50%	50%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,157, df=3, p-value=0,984

Yates' chi-squared test: 0,685

Yates' p-value: 0,876



- Distribuzione dell'evoluzione clinica per allele protettivo:

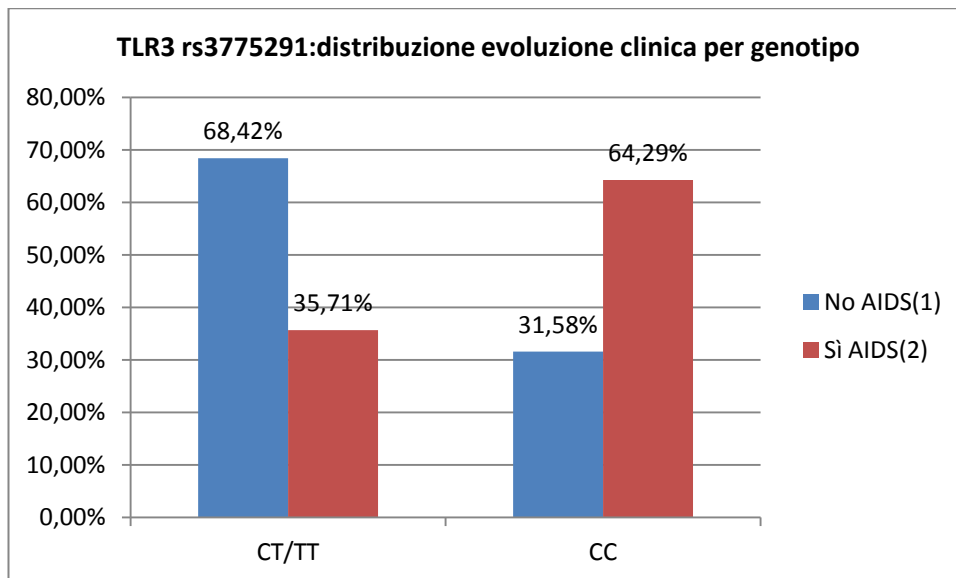
Evol. Clinica	TLR3 rs 3775291		
	CT/TT	CC	tot
No AIDS(1)	13	6	19
	68,42%	31,58%	100%
Si AIDS(2)	5	9	14
	35,71%	64,29%	100%

Chi-squared test

X-squared=3,78, df=1, p-value=0,0621

Yates' chi-squared test: 2,284

Yates' p-value: 0,130



- Distribuzione dell' assunzione di terapia HAART per allele protettivo:

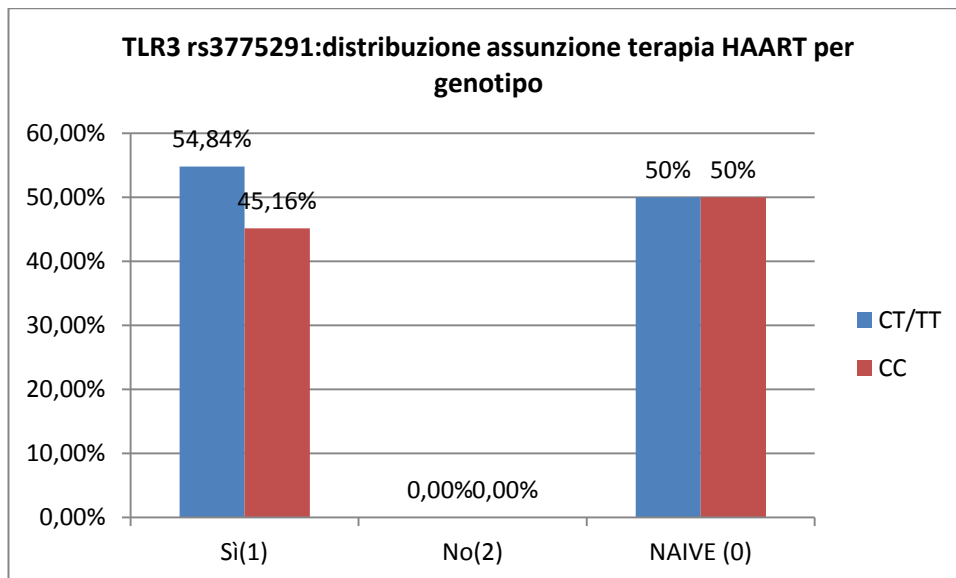
Terapia HAART	TLR3 rs 3775291		
	CT/TT	CC	tot
Si(1)	17	14	31
	54,84%	45,16%	100%
No(2)	0	0	0
			0%
NAIVE (0)	1	1	2
	50%	50%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,018, df=1, p-value=0,893

Yates' chi-squared test: 0,359

Yates' p-value: 0,549



- Distribuzione dell'aderenza alla terapia HAART per allele protettivo:

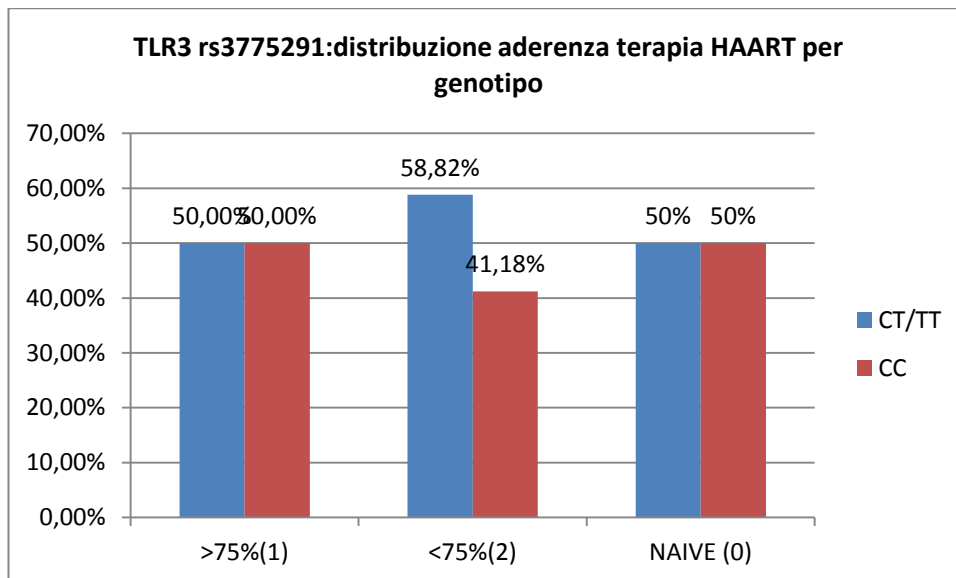
Aderenza	TLR3 rs 3775291		
	CT/TT	CC	tot
>75%(1)	7	7	14
	50,00%	50,00%	100%
<75%(2)	10	7	17
	58,82%	41,18%	100%
NAIVE (0)	1	1	2
	50%	50%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,259, df=2, p-value=0,878

Yates' chi-squared test: 0,355

Yates' p-value: 0,837



APOBEC3H Hap I:

- Distribuzione del sesso per aplotipo protettivo:

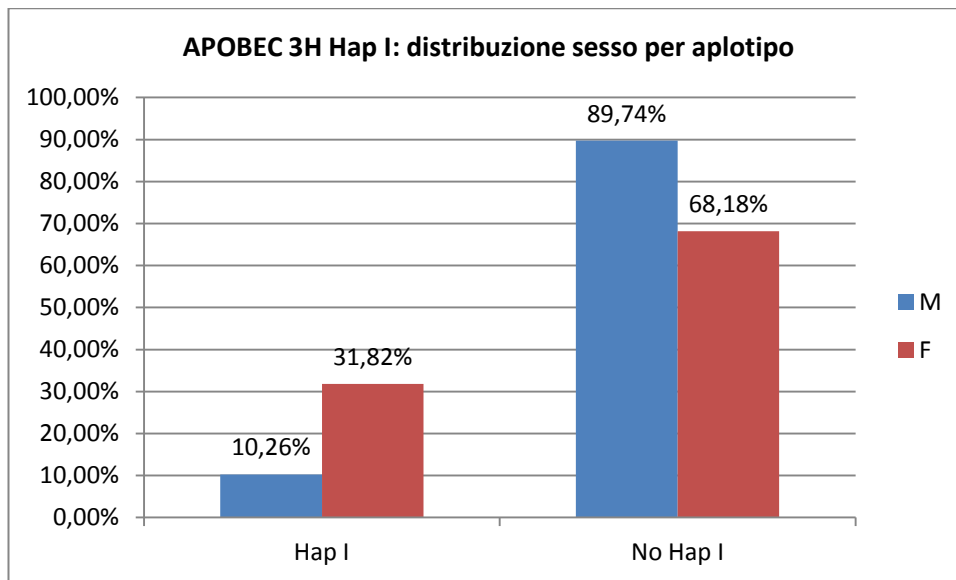
SEX	Hap I	No Hap I	Tot
M	4	35	39
	10,26%	89,74%	100%
F	7	15	22
	31,82%	68,18%	100%

Chi-squared test

X-squared=4,424, df=1, p-value=0,035

Yates' chi-squared test: 3,086

Yates' p-value: 0,0789



- Distribuzione del fattore di rischio per aplotipo protettivo:

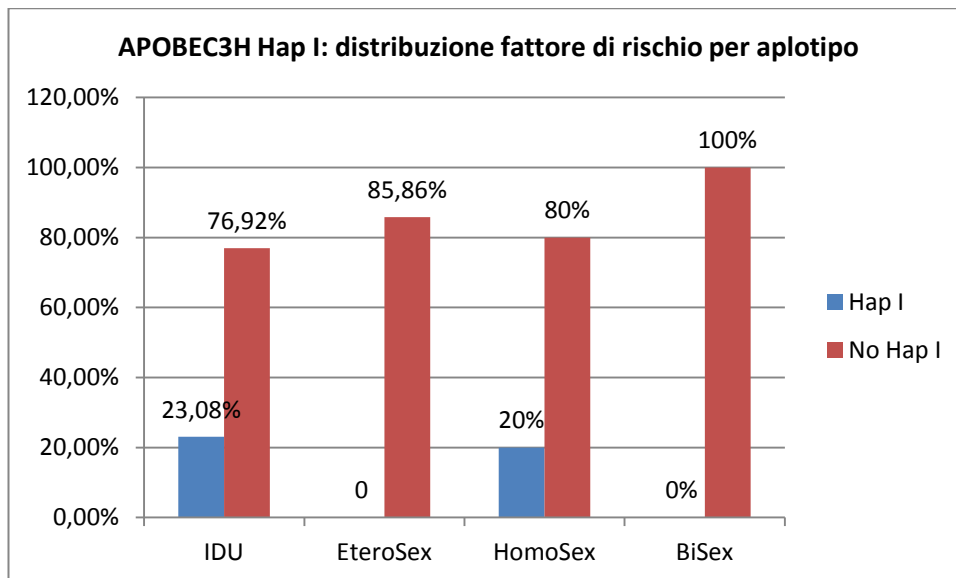
Fatt. Rischio	Hap I	No Hap I	Tot
IDU	6	20	26
	23,08%	76,92%	100%
EteroSex	4	23	27
	14,81%%	85,86%	100%
HomoSex	1	4	5
	20%	80%	100%
BiSex	0	3	3
	0%	100%	100%

Chi-squared test

X-squared=1,31, df=3, p-value=0,726

Yates' chi-squared test: 0,427

Yates' p-value: 0,934



- Distribuzione del periodo di infezione da HIV per aplotipo protettivo

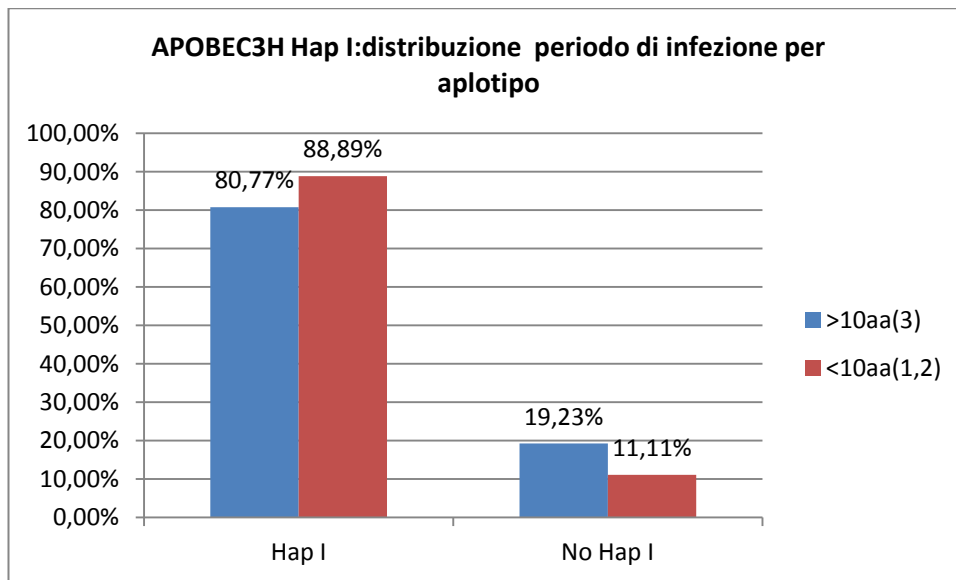
Inf. HIV	Hap I	No Hap I	Tot
>10aa(3)	10	42	52
	80,77%	19,23%	100%
<10aa(1,2)	1	8	9
	88,89%	11,11%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,342, df=1, p-value=0,558

Yates' chi-squared test: 0,013

Yates' p-value: 0,909



- Distribuzione dei pazienti attualmente con linfociti CD4+ >500num/mm³ per aplotipo protettivo:

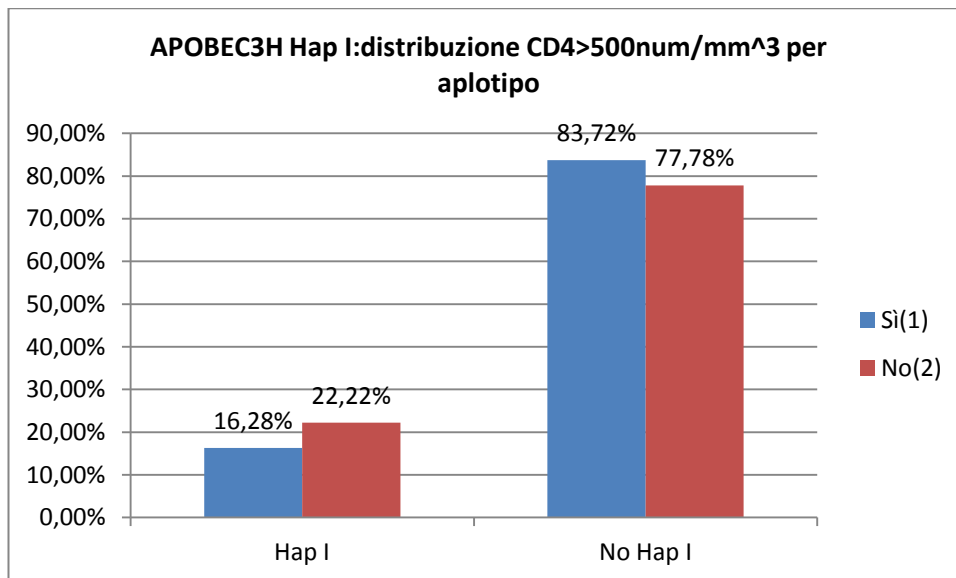
CD4>500	Hap I	No Hap I	Tot
Si(1)	7	36	43
	16,28%	83,72%	100%
No(2)	4	14	18
	22,22%	77,78%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,303, df=1, p-value=0,582

Yates' chi-squared test: 0,034

Yates' p-value: 0,853



- Distribuzione della attuale carica virale plasmatica non rilevabile(VL undetected) per aplotipo protettivo:

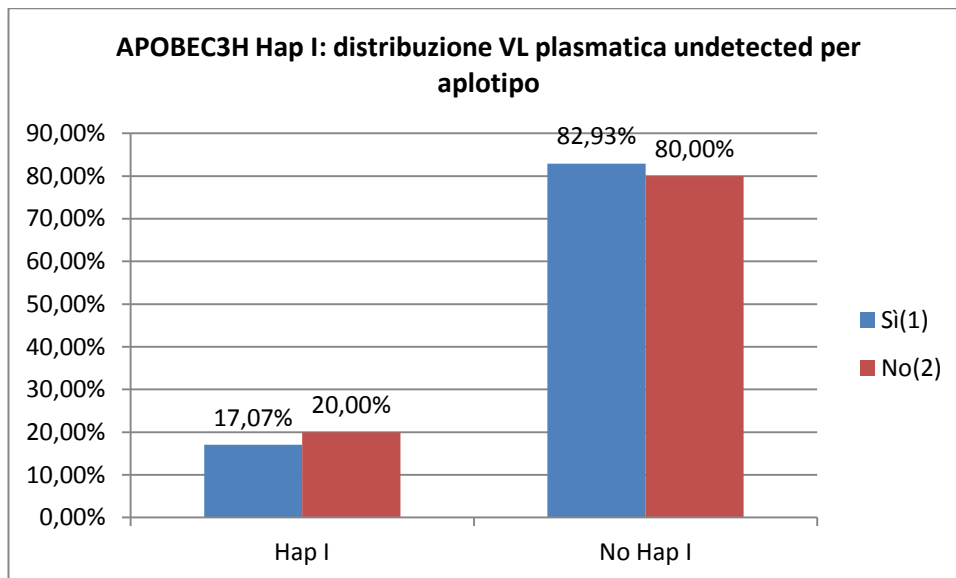
VL undetected	Hap I	No Hap I	Tot
Si(1)	7	34	41
	17,07%	82,93%	100%
No(2)	4	16	20
	20,00%	80,00%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,078, df=1, p-value=0,780

Yates' chi-squared test: 0,006

Yates' p-value: 0,938



- Distribuzione del tempo di soppressione della carica virale plasmatica in presenza di terapia per aplotipo protettivo:

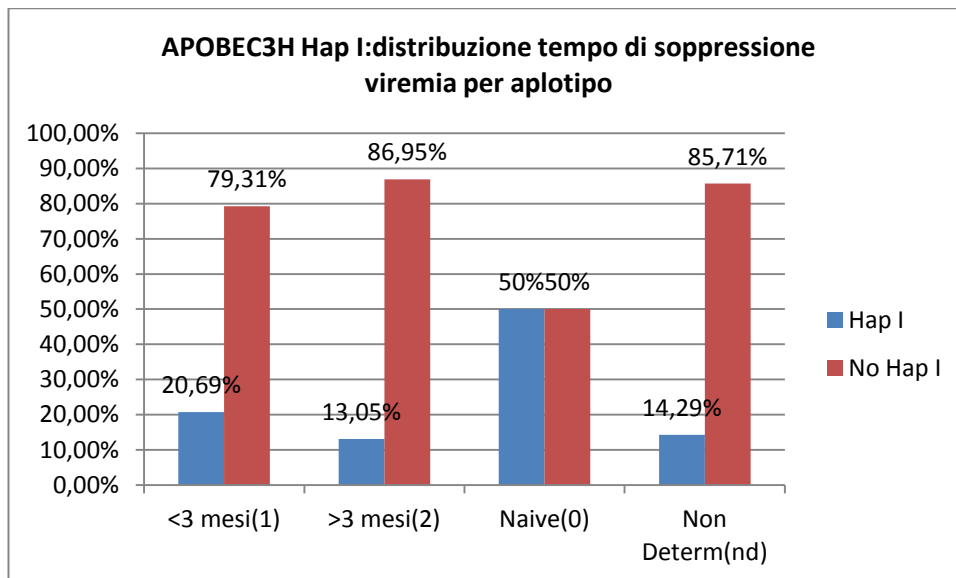
T Soppres.	Hap I	No Hap I	Tot
<3 mesi(1)	6	23	29
	20,69%	79,31%	100%
>3 mesi(2)	3	20	23
	13,05%	86,95%	100%
Naive(0)	1	1	2
	50%	50%	100%
Non Determ(nd)	1	6	7
	14,29%	85,71%	100%

Chi-squared test

X-squared=1,975, df=3, p-value=0,577

Yates' chi-squared test: 0,261

Yates' p-value: 0,967



- Distribuzione dell'evoluzione clinica per aplotipo protettivo:

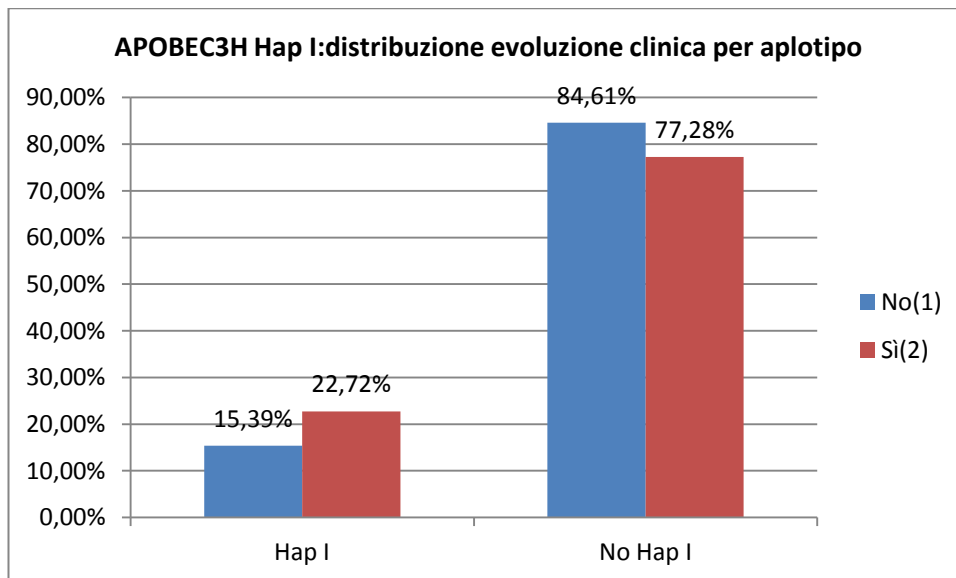
Evol. Clin	Hap I	No Hap I	Tot
No(1)	6	33	39
	15,39%	84,61%	100%
Si(2)	5	17	22
	22,72%	77,28%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,513, df=1, p-value=0,473

Yates' chi-squared test: 0,137

Yates' p-value: 0,711



- Distribuzione dell' assunzione di terapia HAART per aplotipo protettivo:

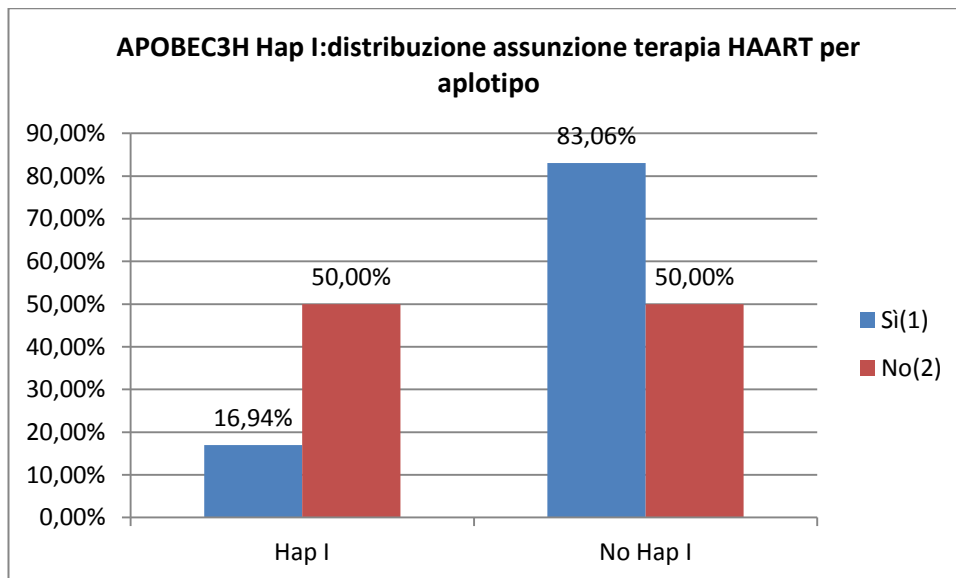
Terapia HAART	Hap I	No Hap I	Tot
Si(1)	10	49	59
	16,94%	83,06%	100%
No(2)	1	1	2
	50,00%	50,00%	100%

Chi-squared test

X-squared=1,43, df=1, p-value=0,231

Yates' chi-squared test: 0,068

Yates' p-value: 0,794



- Distribuzione dell'aderenza alla terapia HAART per aplotipo protettivo:

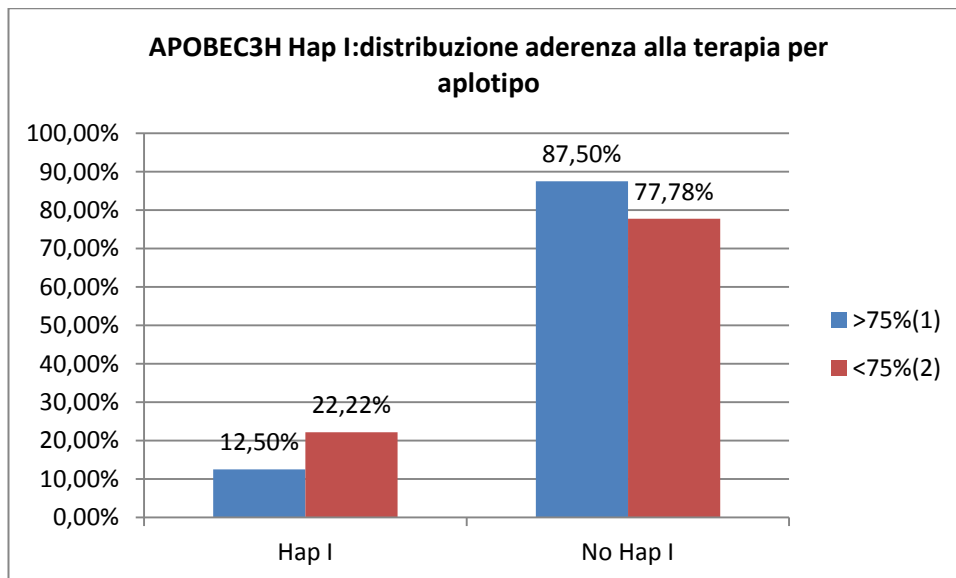
Aderenza	Hap I	No Hap I	Tot
>75%(1)	4	28	32
	12,50%	87,50%	100%
<75%(2)	6	21	27
	22,22%	77,78%	100%

Chi-squared test

X-squared=2,366, df=2, p-value=0,306

Yates' chi-squared test: 0,507

Yates' p-value: 0,776



ERAP2 rs2549782:

- Distribuzione del sesso per allele protettivo:

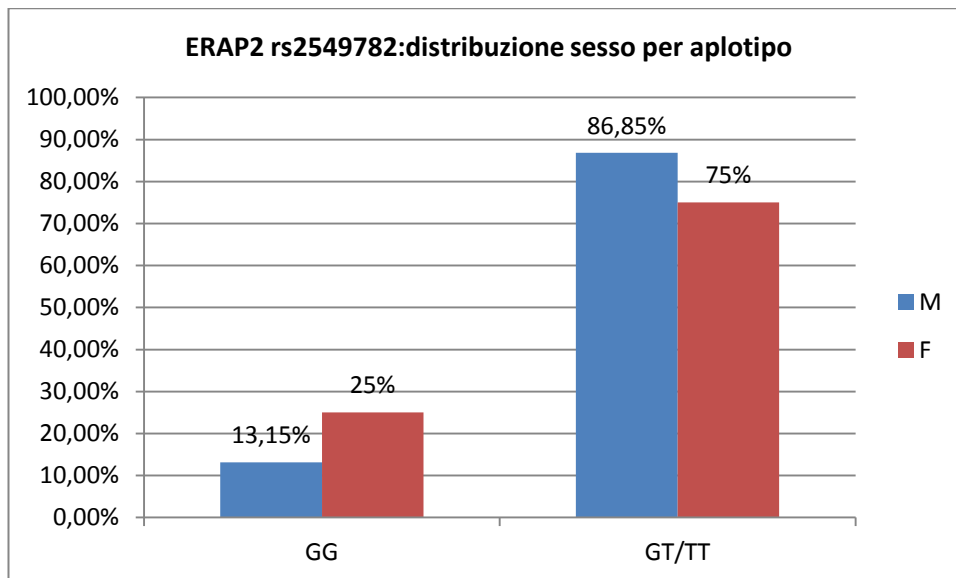
SEX	ERAP2 rs2549782		
	GG	GT/TT	Tot
M	5	33	38
	13,15%	86,85%	100%
F	5	15	20
	25%	75%	100%

Chi-squared test

X-squared=1,288, df=1, p-value=0,256

Yates' chi-squared test: 0,592

Yates' p-value: 0,441



- Distribuzione del fattore di rischio per allele protettivo:

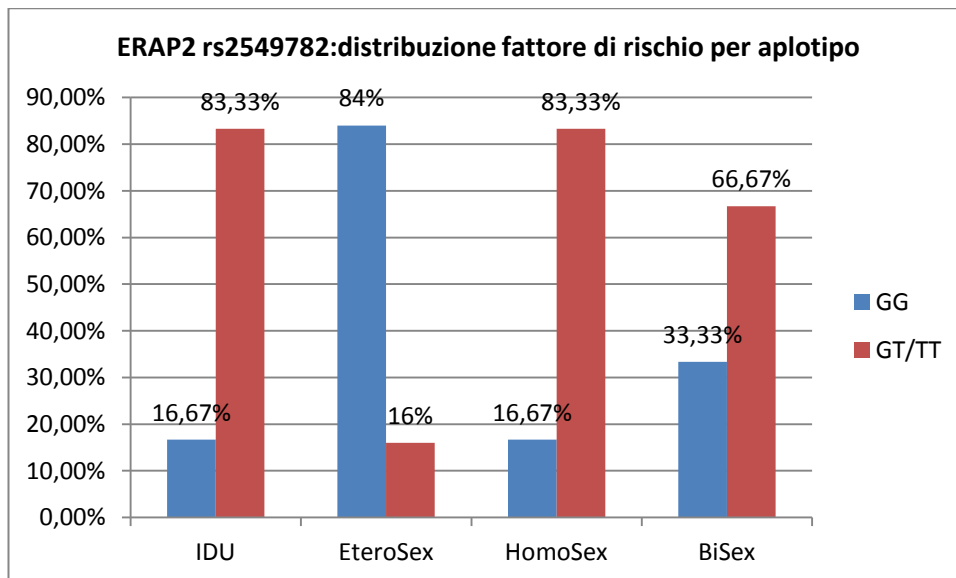
Fatt. Rischio	ERAP2 rs2549782		
	GG	GT/TT	Tot
IDU	4	20	24
	16,67%	83,33%	100%
EteroSex	4	21	25
	84%	16%	100%
HomoSex	1	5	6
	16,67%	83,33%	100%
BiSex	1	2	3
	33,33%	66,67%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,578, df=3, p-value=0,901

Yates' chi-squared test: 0,302

Yates' p-value: 0,959



- Distribuzione del periodo di infezione da HIV per allele protettivo:

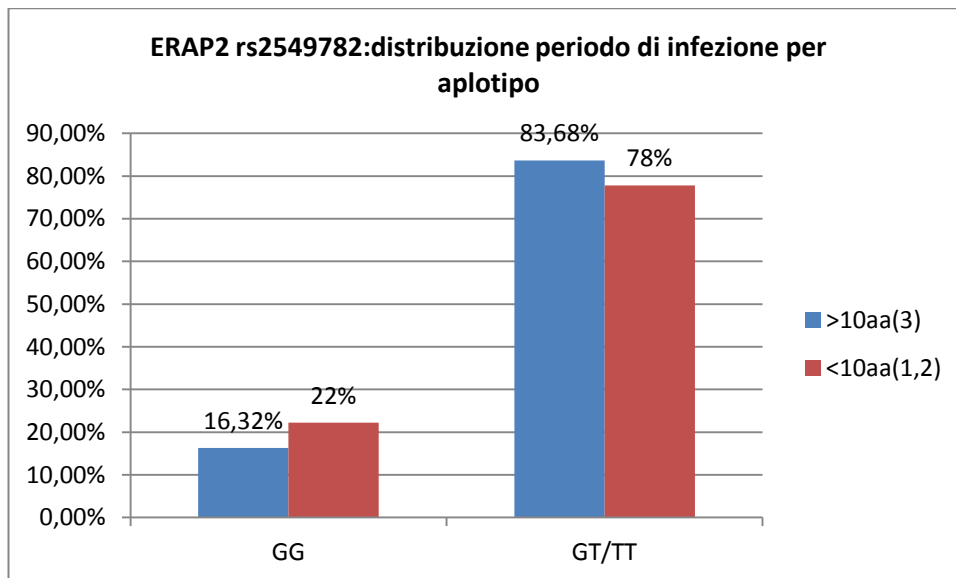
Inf.HIV	ERAP2 rs2549782		
	GG	GT/TT	Tot
>10aa(3)	8	41	49
	16,32%	83,68%	100%
<10aa(1,2)	2	7	9
	22%	78%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,185, df=1, p-value=0,667

Yates' chi-squared test: 0,002

Yates' p-value: 0,964



- Distribuzione dei pazienti attualmente con linfociti CD4+ >500num/mm³ per allele protettivo:

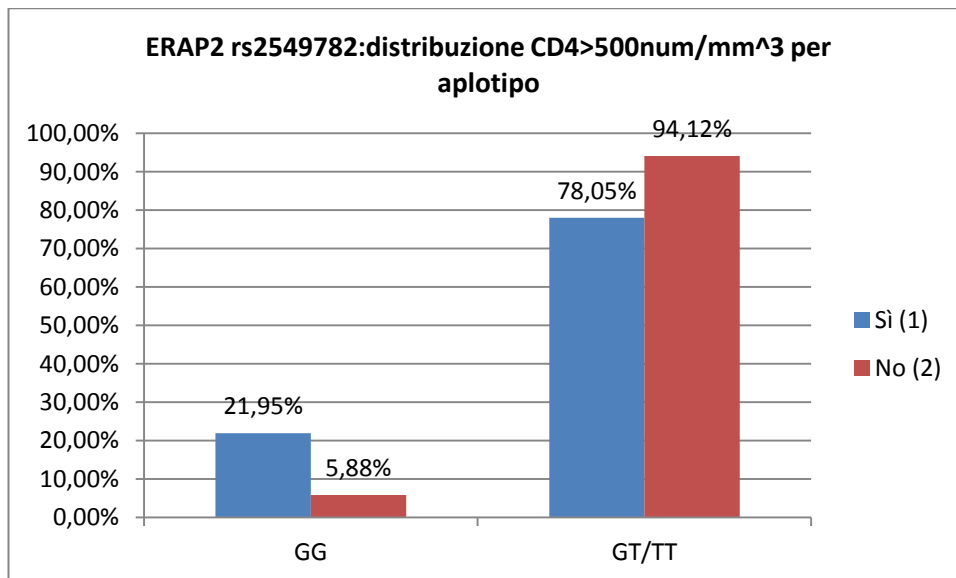
CD4>500	ERAP2 rs2549782		
	GG	GT/TT	Tot
Si (1)	9	32	41
	21,95%	78,05%	100%
No (2)	1	16	17
	5,88%	94,12%	100%

Chi-squared test

X-squared=2,175, df=1, p-value=0,140

Yates' chi-squared test: 1,194

Yates' p-value: 0,274



- Distribuzione della attuale carica virale plasmatica non rilevabile (VL undetected) per allele protettivo:

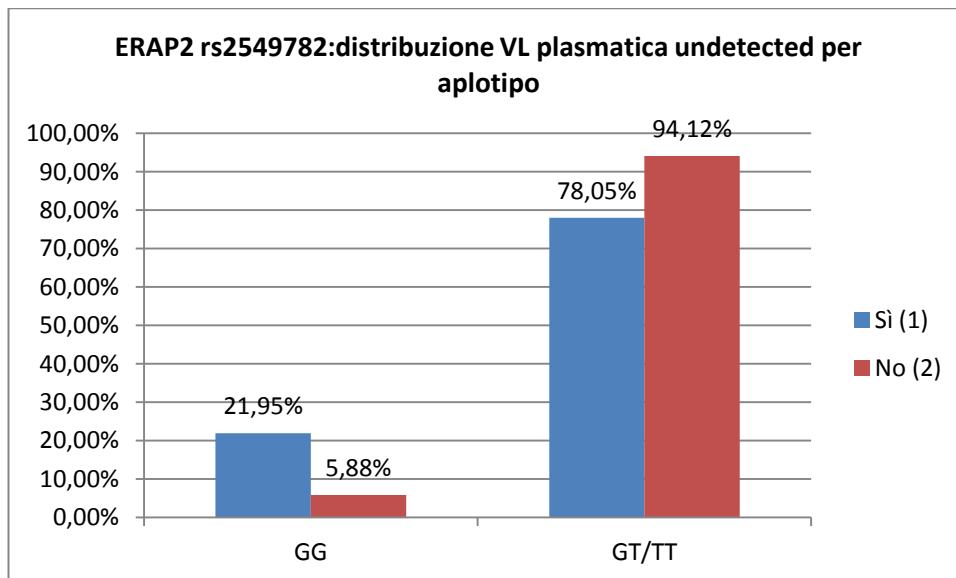
VL undetected	ERAP2 rs2549782		
	GG	GT/TT	Tot
Si (1)	9	32	41
	21,95%	78,05%	100%
No (2)	1	16	17
	5,88%	94,12%	100%

Chi-squared test

X-squared=2,175, df=1, p-value=0,140

Yates' chi-squared test: 1,194

Yates' p-value: 0,274



- Distribuzione del tempo di soppressione della carica virale plasmatica in presenza di terapia per allele protettivo:

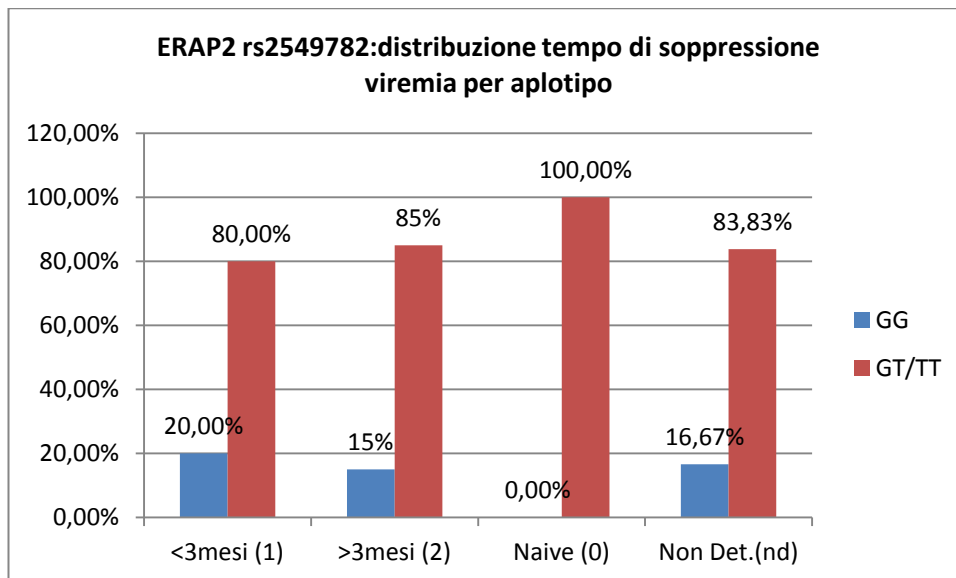
T Soppr.	ERAP2 rs2549782		
	GG	GT/TT	Tot
<3mesi (1)	6	24	30
	20,00%	80,00%	100%
>3mesi (2)	3	17	20
	15%	85%	100%
Naive (0)	0	2	2
	0,00%	100,00%	100%
Non Det.(nd)	1	5	6
	16,67%	83,83%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,648, df=3, p-value=0,885

Yates' chi-squared test:0,364

Yates' p-value: 0,947



- Distribuzione dell'evoluzione clinica per allele protettivo:

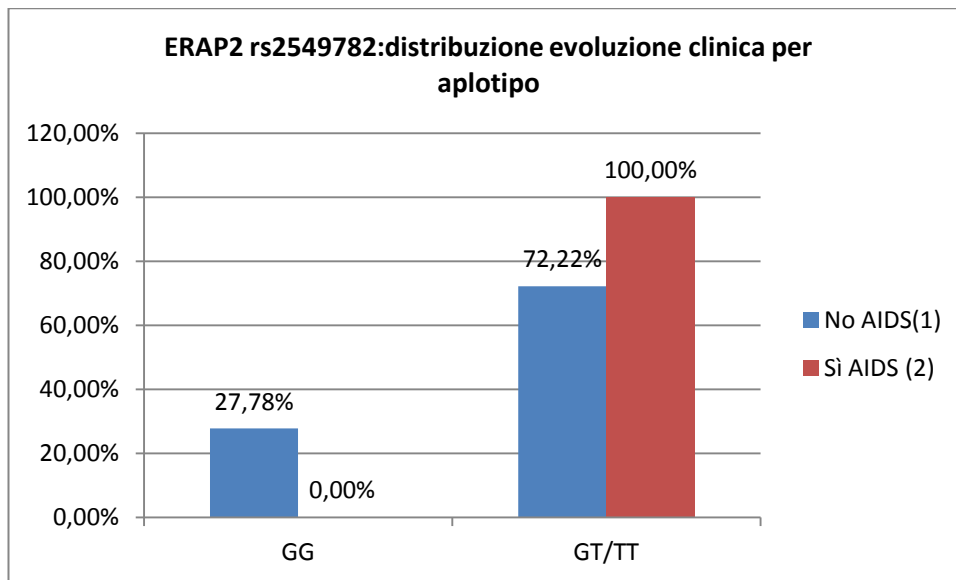
Evol Clin.	ERAP2 rs2549782		
	GG	GT/TT	Tot
No AIDS(1)	10	26	36
	27,78%	72,22%	100%
Si AIDS (2)	0	22	22
	0,00%	100,00%	100%

Chi-squared test

X-squared=7,384, df=1, p-value=0,006

Yates' chi-squared test:5,566

Yates' p-value: 0,0183



- Distribuzione dell' assunzione di terapia HAART per allele protettivo:

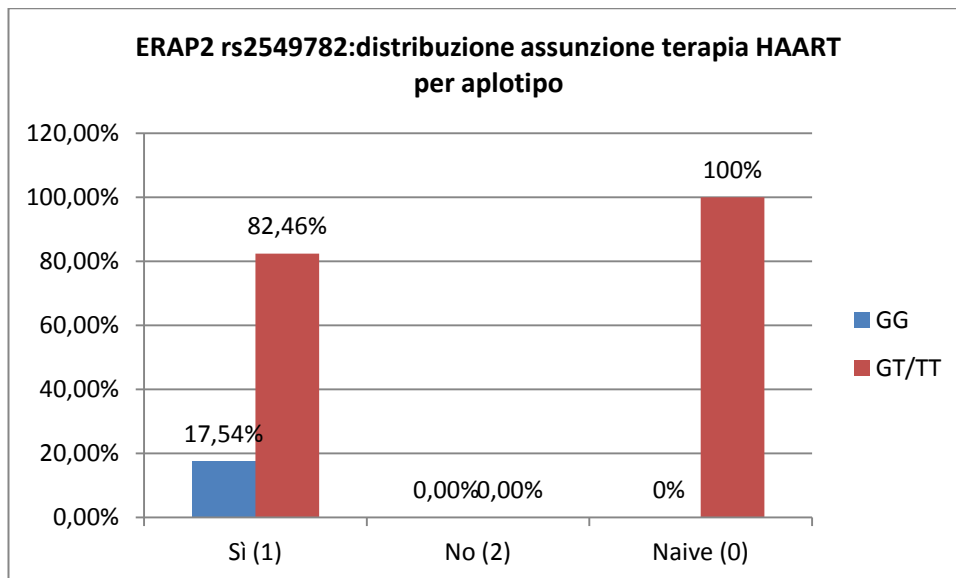
Ter.HAART	ERAP2 rs2549782		
	GG	GT/TT	Tot
Sì (1)	10	47	57
	17,54%	82,46%	100%
No (2)	0	0	0
	0%	0%	0%
Naive (0)	0	1	1
	0%	100%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,212, df=1, p-value=0,645

Yates' chi-squared test:0,765

Yates' p-value: 0,381



- Distribuzione dell'aderenza alla terapia HAART per allele protettivo:

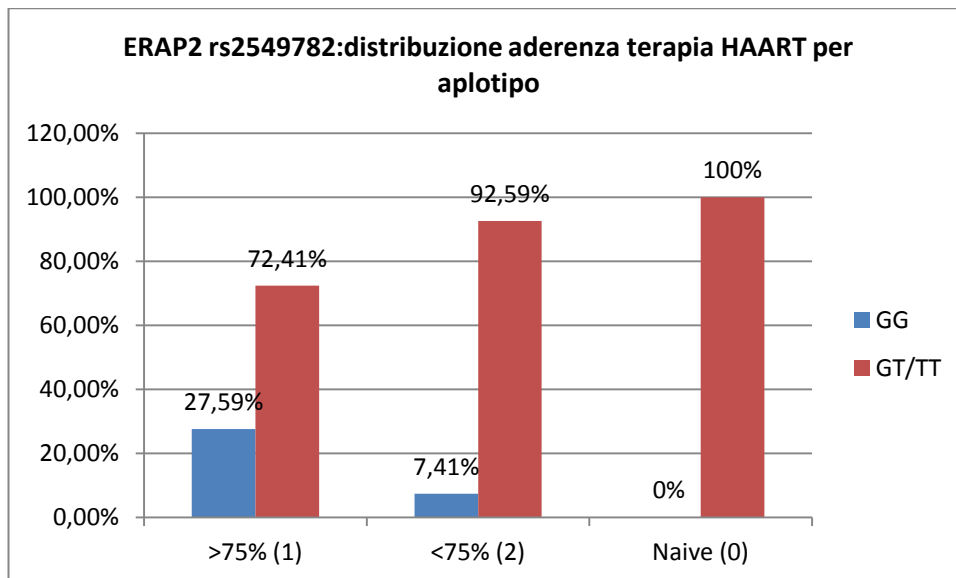
Aderenza	ERAP2 rs2549782		
	GG	GT/TT	Tot
>75% (1)	8	21	29
	27,59%	72,41%	100%
<75% (2)	2	25	27
	7,41%	92,59%	100%
Naive (0)	0	2	2
	0%	100%	100%

Chi-squared test

X-squared=4,422, df=2, p-value=0,109

Yates' chi-squared test:2,80

Yates' p-value: 0,246



MX2 rs2074560:

- Distribuzione del sesso per allele protettivo:

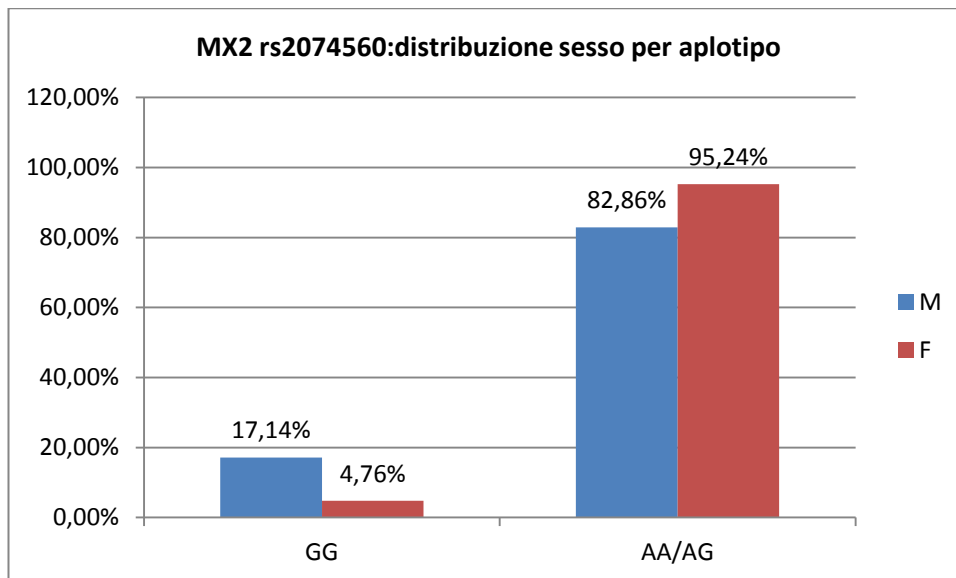
SEX	MX2 rs2074560		
	GG	AA/AG	Tot
M	6 17,14%	29 82,86%	35 100%
F	1 4,76%	20 95,24%	21 100%

Chi-squared test

X-squared=1,839, df=1, p-value=0,175

Yates' chi-squared test:0,882

Yates' p-value: 0,347



- Distribuzione del fattore di rischio per allele protettivo:

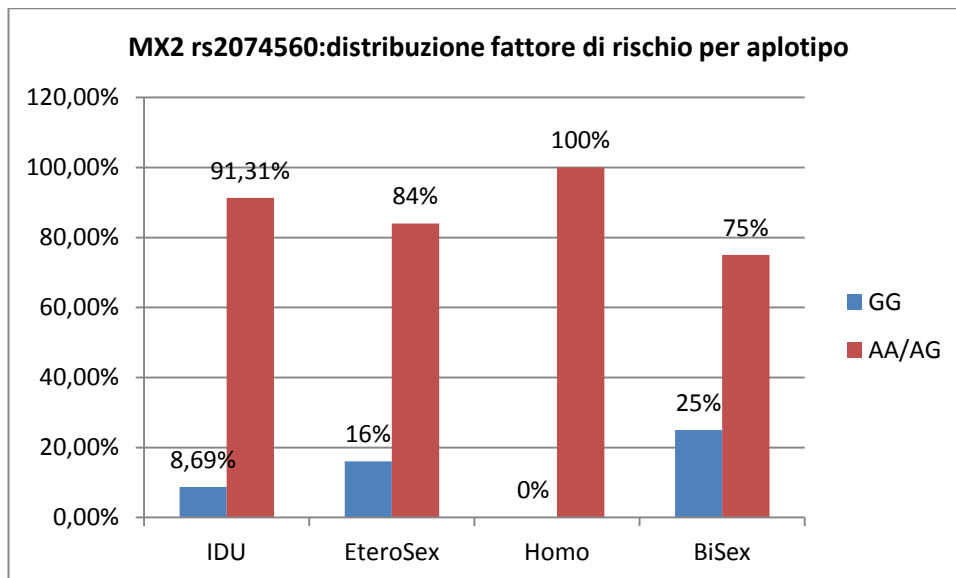
Fatt.Rischio	MX2 rs2074560		
	GG	AA/AG	Tot
IDU	2	21	23
	8,69%	91,31%	100%
EteroSex	4	21	25
	16%	84%	100%
Homo	0	4	4
	0%	100%	100%
BiSex	1	3	4
	25%	75%	100%

Chi-squared test

X-squared=1,27, df=3, p-value=0,630

Yates' chi-squared test:0,107

Yates' p-value: 0,990



- Distribuzione del periodo di infezione da HIV per allele protettivo:

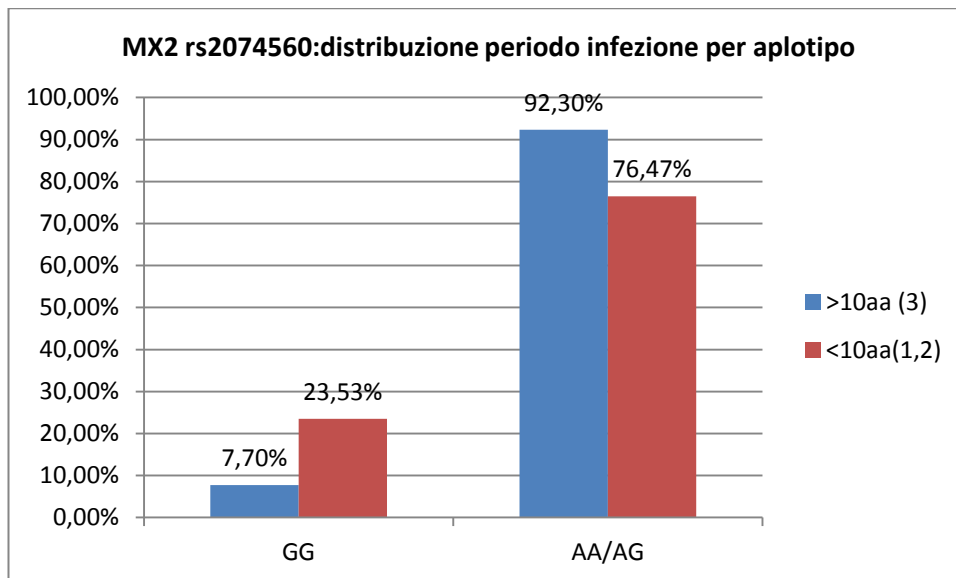
Inf.HIV	MX2 rs2074560		
	GG	AA/AG	Tot
>10aa (3)	3	36	39
	7,70%	92,30%	100%
<10aa(1,2)	4	13	17
	23,53%	76,47%	100%

Chi-squared test

X-squared=2,715, df=1, p-value=0,099

Yates' chi-squared test:1,46

Yates' p-value: 0,226



- Distribuzione dei pazienti attualmente con linfociti CD4+ >500num/mm³ per allele protettivo:

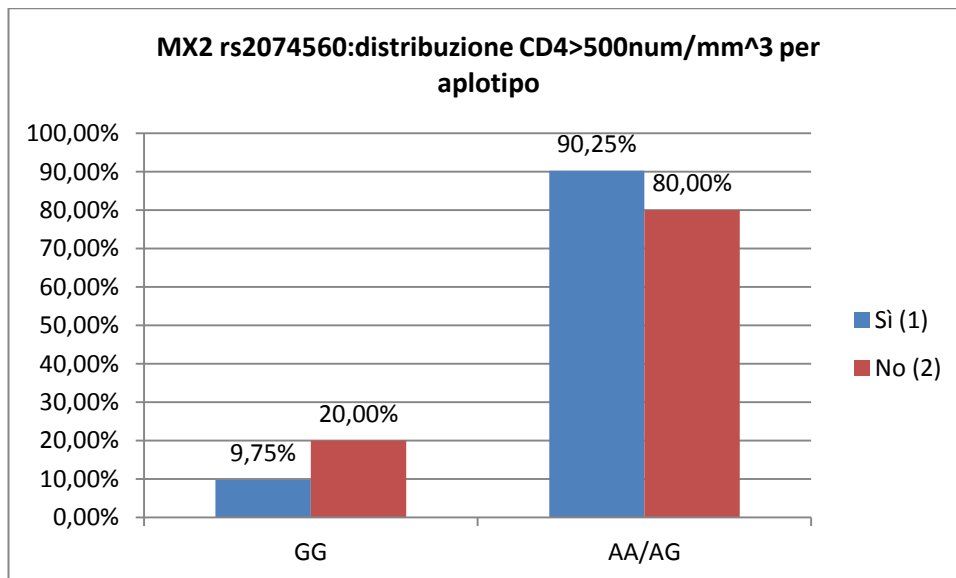
CD4>500	MX2 rs2074560	AA/AG	
	GG		Tot
Sì (1)	4	37	41
	9,75%	90,25%	100%
No (2)	3	12	15
	20,00%	80,00%	100%

Chi-squared test

X-squared=1,054, df=1, p-value=0,304

Yates' chi-squared test:0,325

Yates' p-value: 0,568



- Distribuzione della attuale carica virale plasmatica non rilevabile (VL undetected) per allele protettivo:

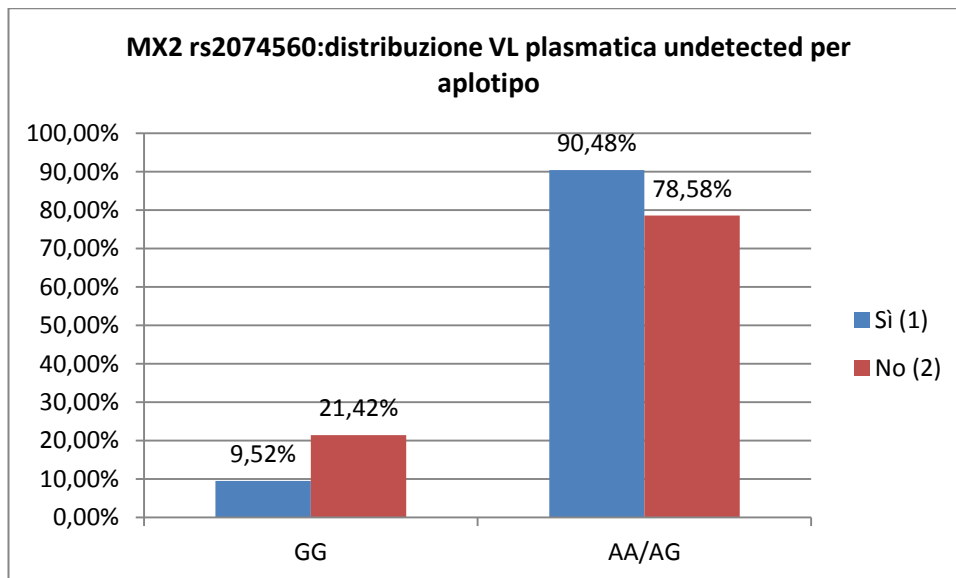
VL undet.	MX2 rs2074560		
	GG	AA/AG	Tot
Si (1)	4	38	42
	9,52%	90,48%	100%
No (2)	3	11	14
	21,42%	78,58%	100%

Chi-squared test

X-squared=1,361, df=1, p-value=0,243

Yates' chi-squared test:0,49

Yates' p-value: 0,483



- Distribuzione del tempo di soppressione della carica virale plasmatica in presenza di terapia per allele protettivo:

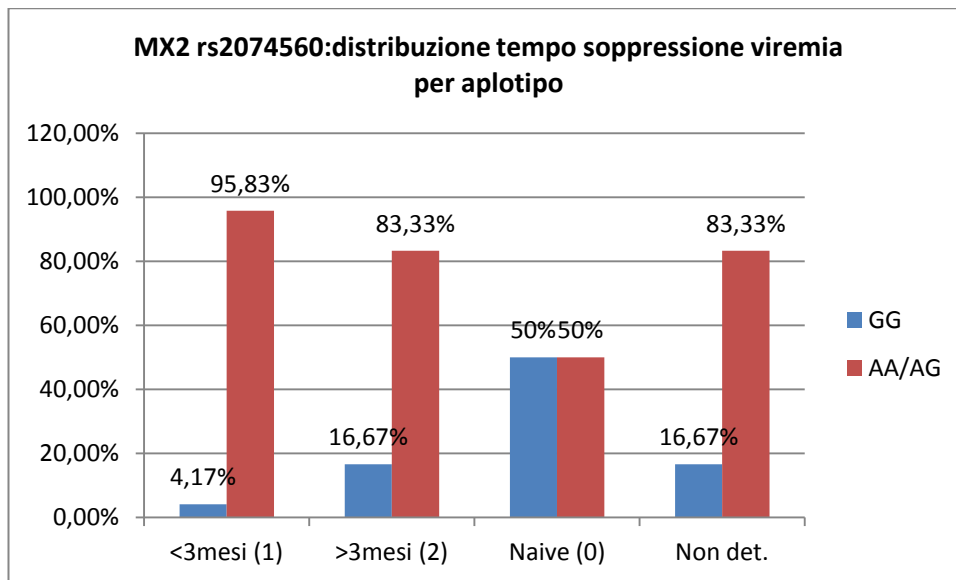
T Soppr.	MX2 rs2074560		
	GG	AA/AG	Tot
<3mesi (1)	1	23	24
	4,17%	95,83%	100%
>3mesi (2)	4	20	24
	16,67%	83,33%	100%
Naive (0)	1	1	2
	50%	50%	100%
Non det.	1	5	6
	16,67%	83,33%	100%

Chi-squared test

X-squared=4,571, df=3, p-value=0,206

Yates' chi-squared test:1,333

Yates' p-value: 0,721



- Distribuzione dell'evoluzione clinica per allele protettivo:

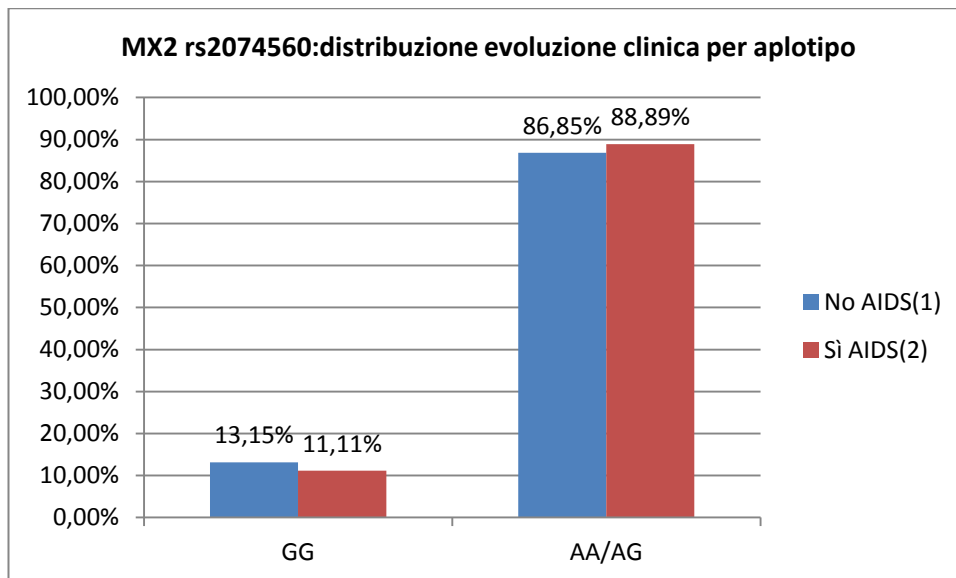
Evol.Clinica	MX2 rs2074560		
	GG	AA/AG	Tot
No AIDS(1)	5	33	38
	13,15%	86,85%	100%
Si AIDS(2)	2	16	18
	11,11%	88,89%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,047, df=1, p-value=0,828

Yates' chi-squared test:0,047

Yates' p-value: 0,828



- Distribuzione dell' assunzione di terapia HAART per allele protettivo:

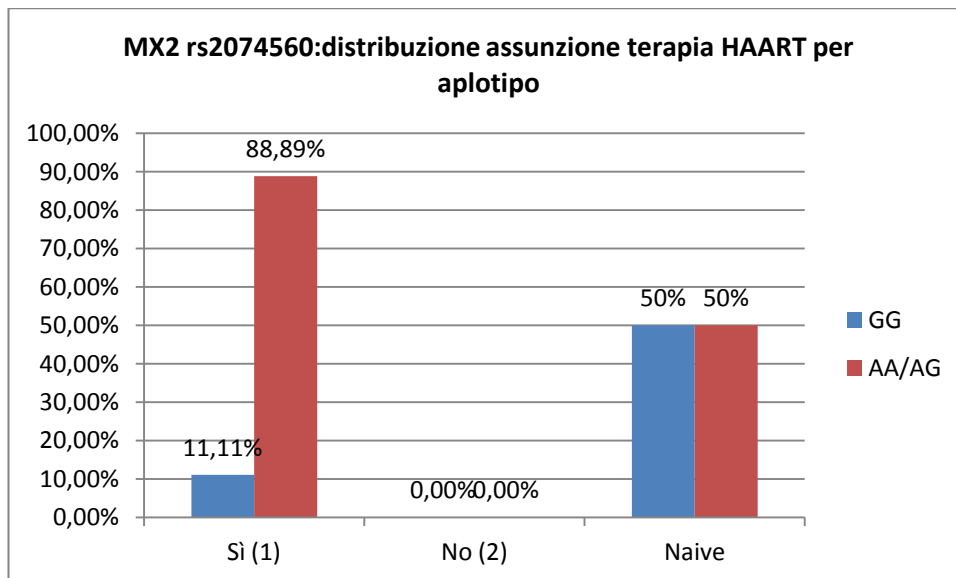
Ter.HAART	MX2 rs2074560		
	GG	AA/AG	Tot
Si (1)	6	48	54
	11,11%	88,89%	100%
No (2)	0	0	0
			100%
Naive	1	1	2
	50%	50%	100%

Chi-squared test

X-squared=2,667, df=1, p-value=0,102

Yates' chi-squared test:0,296

Yates' p-value: 0,586



- Distribuzione dell'aderenza alla terapia HAART per allele protettivo:

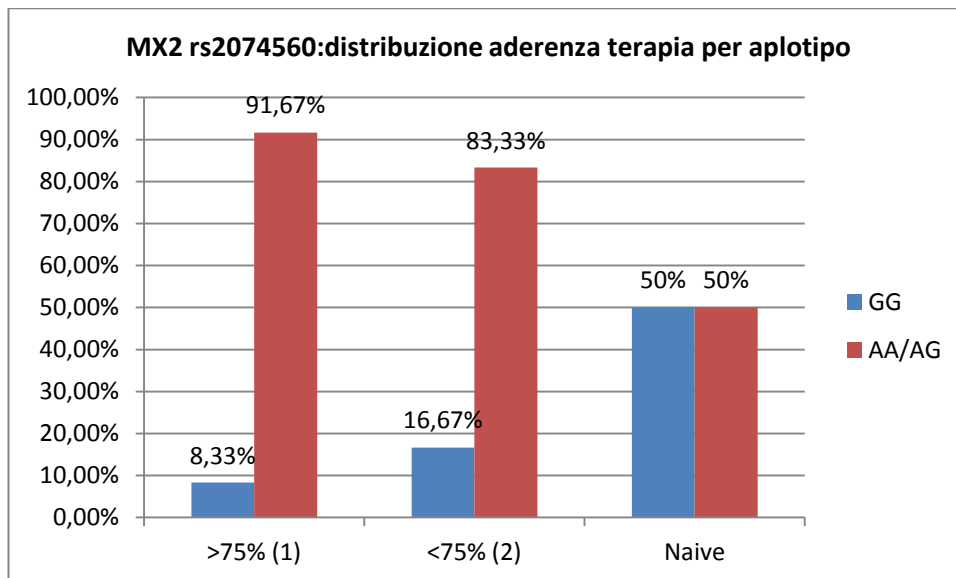
Aderenza	MX2 rs2074560		
	GG	AA/AG	Tot
>75% (1)	3	33	36
	8,33%	91,67%	100%
<75% (2)	3	15	18
	16,67%	83,33%	100%
Naive	1	1	2
	50%	50%	100%

Chi-squared test

X-squared=3,429, df=2, p-value=0,180

Yates' chi-squared test:0,571

Yates' p-value: 0,751



RAC2 Hap T:

- Distribuzione del sesso per aplotipo protettivo:

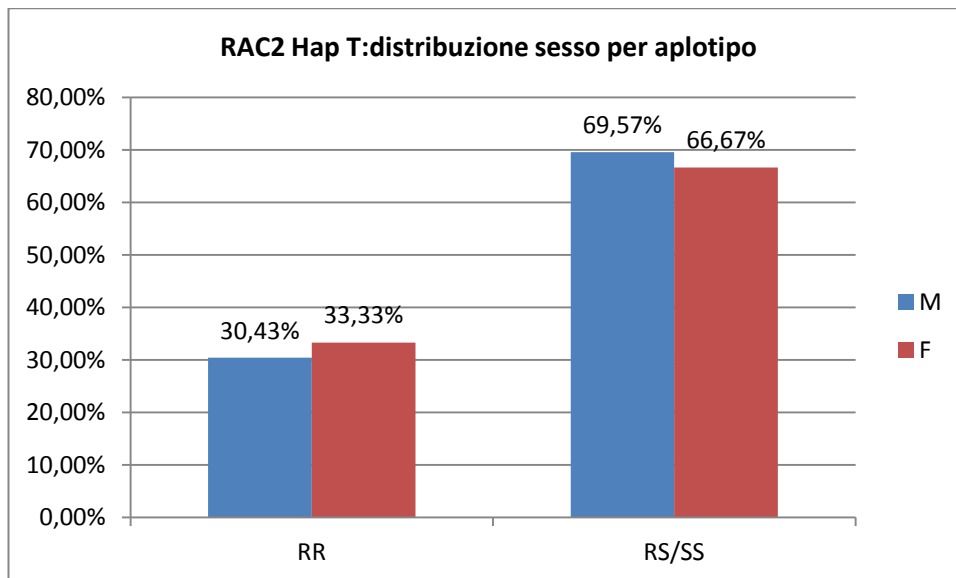
SEX	RAC2 Hap T		
	RR	RS/SS	Tot
M	7	16	23
	30,43%	69,57%	100%
F	5	10	15
	33,33%	66,67%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,035, df=1, p-value=0,851

Yates' chi-squared test:0,029

Yates' p-value: 0,864



- Distribuzione del fattore di rischio per aplotipo protettivo:

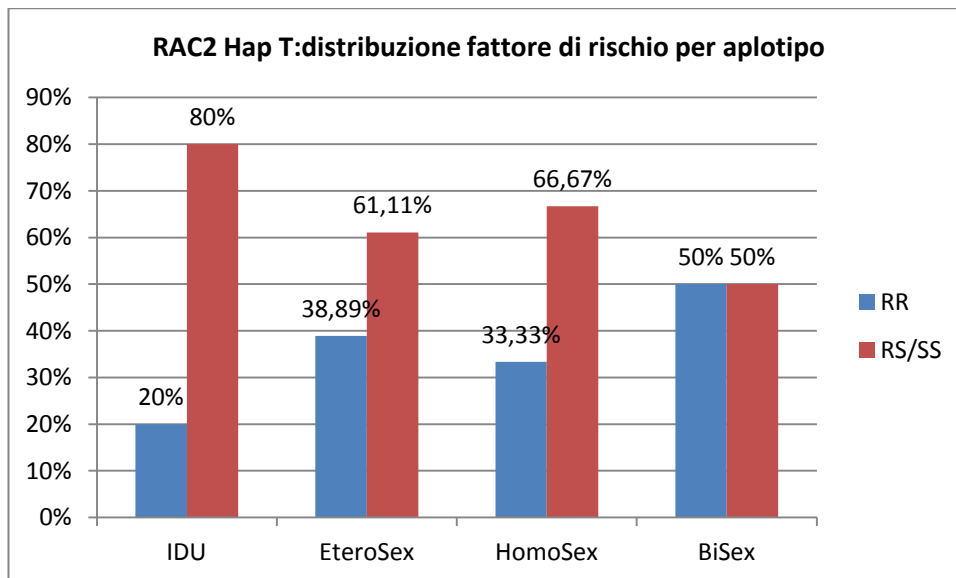
Fatt. Rischio	RAC2 Hap T		
	RR	RS/SS	Tot
IDU	3	12	15
	20%	80%	100%
EteroSex	7	11	18
	38,89%	61,11%	100%
HomoSex	1	2	3
	33,33%	66,67%	100%
BiSex	1	1	2
	50%	50%	100%

Chi-squared test

X-squared=1,694, df=3, p-value=0,638

Yates' chi-squared test:0,992

Yates' p-value: 0,803



- Distribuzione del periodo di infezione da HIV per aplotipo protettivo:

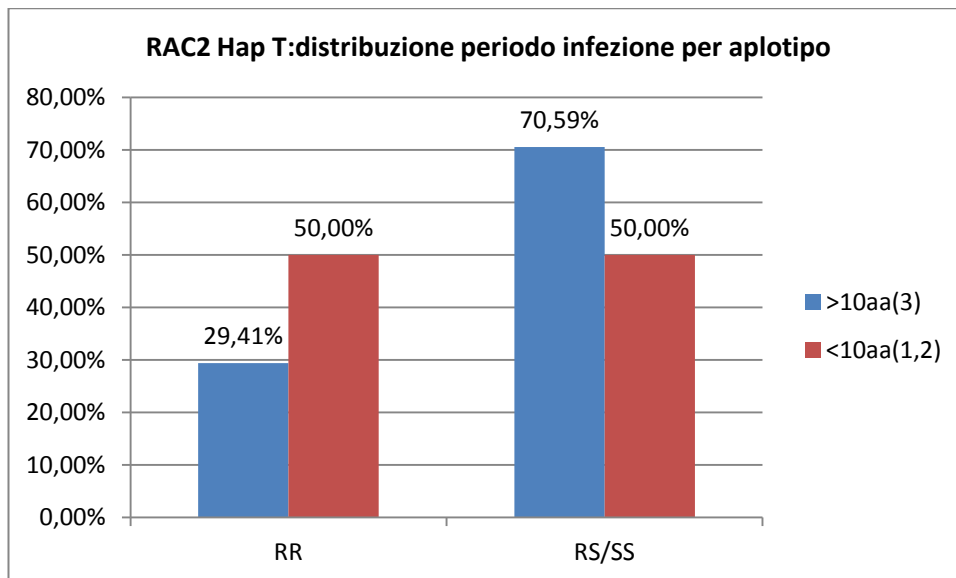
Inf.HIV	RAC2 Hap T		
	RR	RS/SS	Tot
>10aa(3)	10	24	34
	29,41%	70,59%	100%
<10aa(1,2)	2	2	4
	50,00%	50,00%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,702, df=1, p-value=0,402

Yates' chi-squared test:0,073

Yates' p-value: 0,787



- Distribuzione dei pazienti attualmente con linfociti CD4+ >500num/mm³ per aplotipo protettivo:

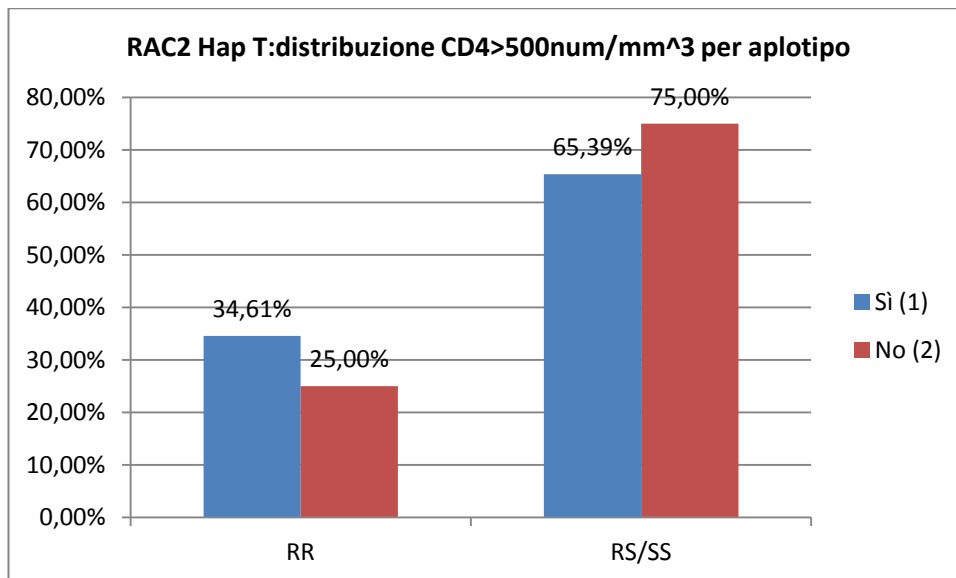
CD4>500	RAC2 Hap T		
	RR	RS/SS	Tot
Sì (1)	9	17	26
	34,61%	65,39%	100%
No (2)	3	9	12
	25,00%	75,00%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,351, df=1, p-value=0,553

Yates' chi-squared test:0,047

Yates' p-value: 0,828



- Distribuzione della attuale carica virale plasmatica non rilevabile (VL undetected) per aplotipo protettivo:

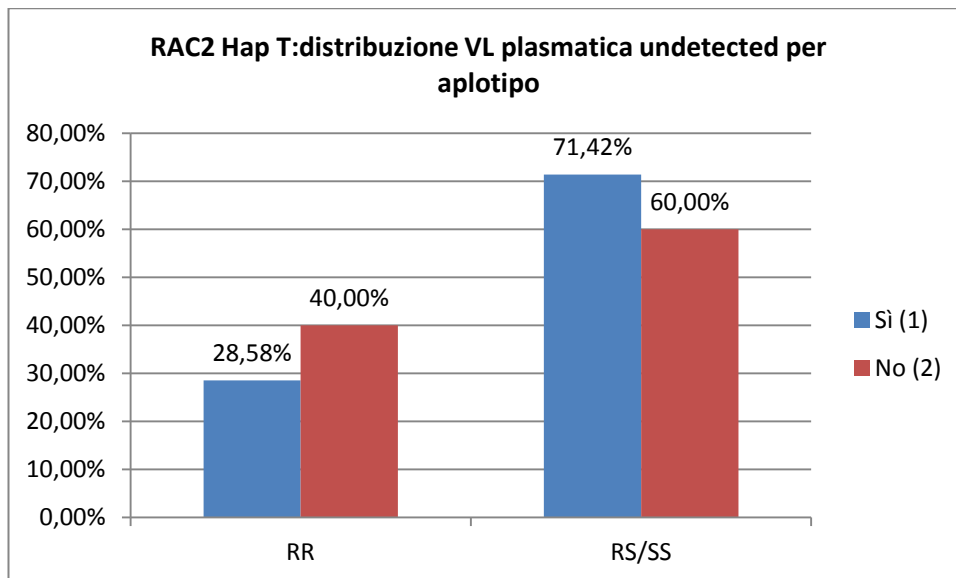
VL undet.	RAC2 Hap T		
	RR	RS/SS	Tot
Si (1)	8	20	28
	28,58%	71,42%	100%
No (2)	4	6	10
	40,00%	60,00%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,445, df=1, p-value=0,504

Yates' chi-squared test:0,074

Yates' p-value: 0,785



- Distribuzione del tempo di soppressione della carica virale plasmatica in presenza di terapia per allele protettivo:

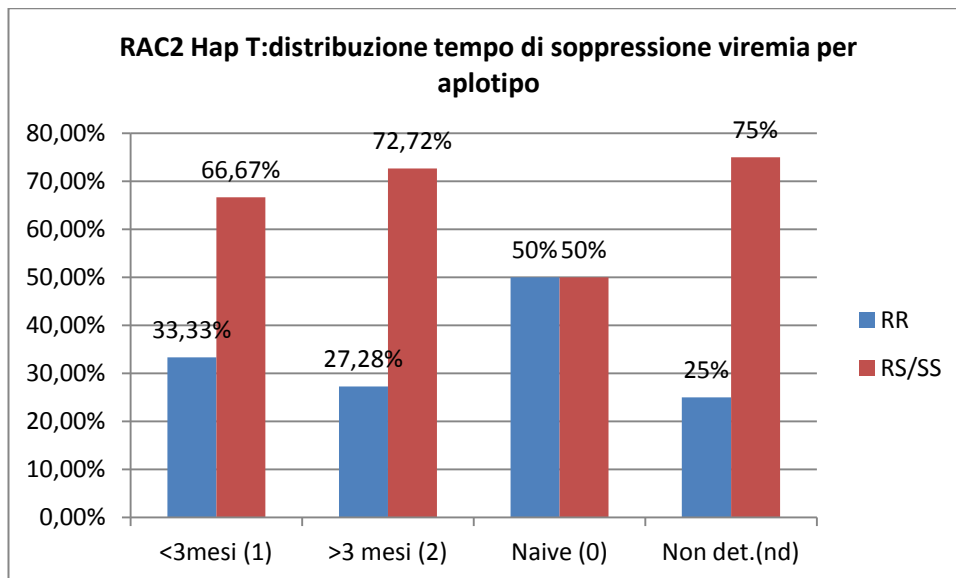
T Soppr.	RAC2 Hap T		
	RR	RS/SS	Tot
<3mesi (1)	7	14	21
	33,33%	66,67%	100%
>3 mesi (2)	3	8	11
	27,28%	72,72%	100%
Naive (0)	1	1	2
	50%	50%	100%
Non det.(nd)	1	3	4
	25%	75%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,519, df=3, p-value=0,914

Yates' chi-squared test:0,109

Yates' p-value: 0,990



- Distribuzione dell'evoluzione clinica per aplotipo protettivo:

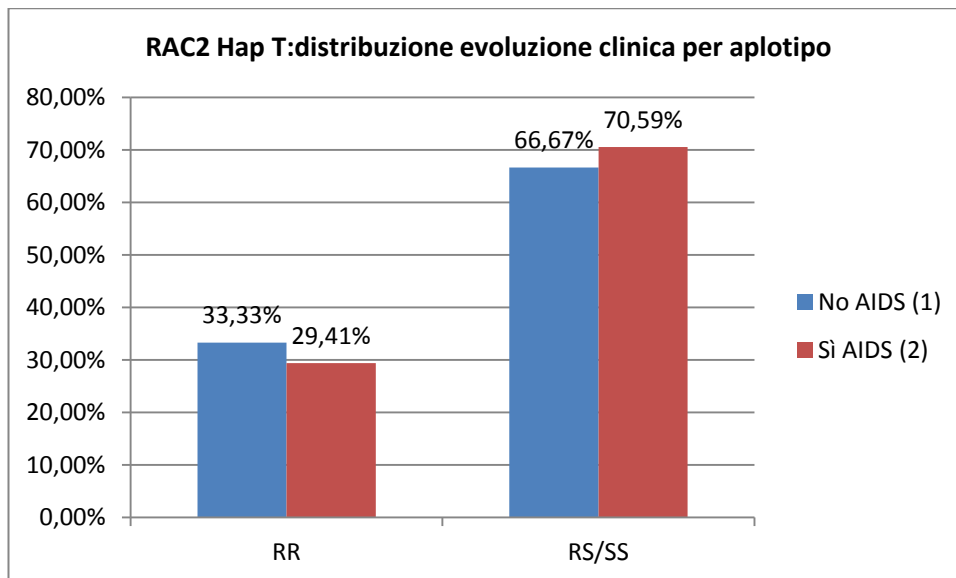
Evol.Clin	RAC2 Hap T		
	RR	RS/SS	Tot
No AIDS (1)	7	14	21
	33,33%	66,67%	100%
Si AIDS (2)	5	12	17
	29,41%	70,59%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,067, df=1, p-value=0,795

Yates' chi-squared test:0,009

Yates' p-value: 0,924



- Distribuzione dell' assunzione di terapia HAART per aplotipo protettivo:

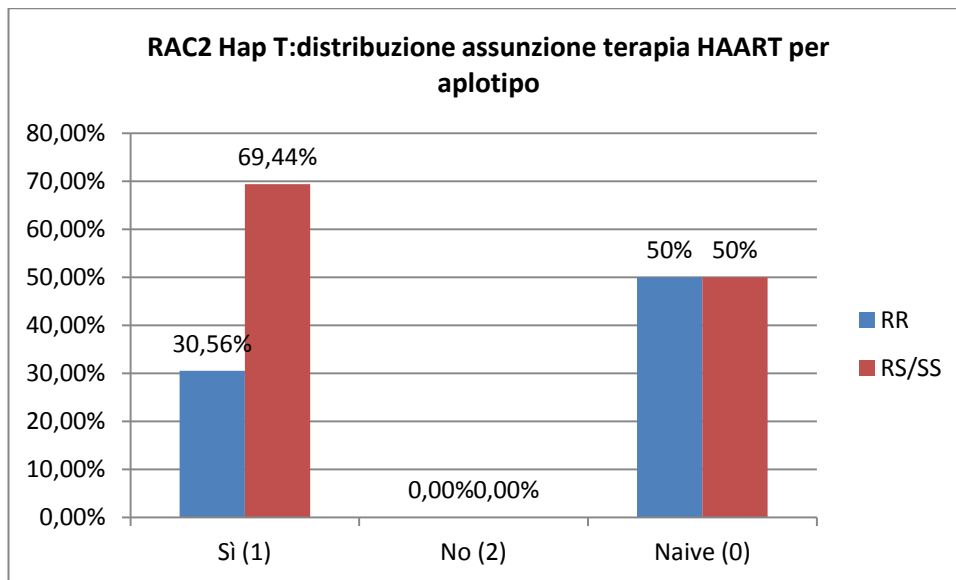
Ter.HAART	RAC2 Hap T		
	RR	RS/SS	Tot
Sì (1)	11	25	36
	30,56%	69,44%	100%
No (2)	0	0	0
			100%
Naive (0)	1	1	2
	50%	50%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,332, df=1, p-value=0,564

Yates' chi-squared test:0,042

Yates' p-value: 0,837



- Distribuzione dell'aderenza alla terapia HAART per aplotipo protettivo:

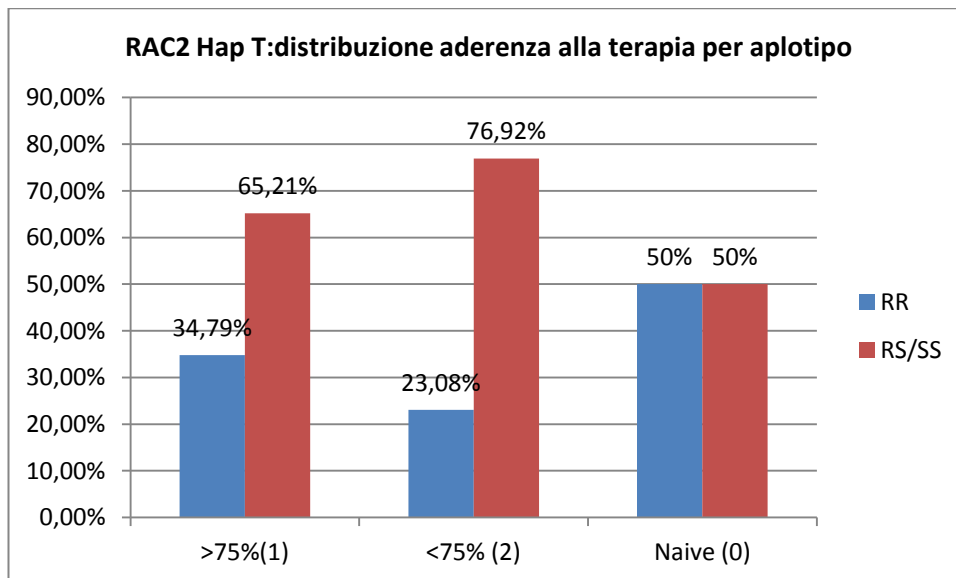
Aderenza	RAC2 Hap T		
	RR	RS/SS	Tot
>75%(1)	8	15	23
	34,79%	65,21%	100%
<75% (2)	3	10	13
	23,08%	76,92%	100%
Naive (0)	1	1	2
	50%	50%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,858, df=2, p-value=0,651

Yates' chi-squared test:0,182

Yates' p-value: 0,913



Studio delle Univariante:

Per ognuno dei quattro geni presi in esame sono state prese in esame anche le caratteristiche cliniche raggruppate come categorie numeriche e per ciascuna di esse sono stati calcolati valore minimo e massimo, mediana, media e standard deviation. E' stato inoltre calcolato il valore medio di queste grandezze in funzione dell'allele o dell'aplotipo preso in esame e sono stati tracciati i grafici.

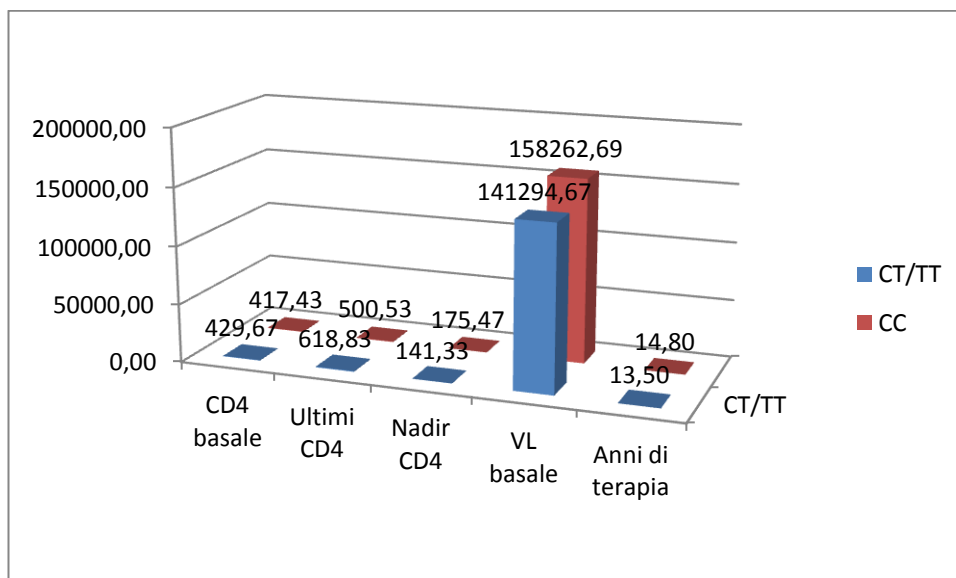
Anche in questo caso è stato utilizzato il programma di elaborazione statistica "R".

TLR3 rs3775291:

TLR3 rs3775291					
	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	VL basale	Anni di terapia
Min	43	56	5	292	0
Mediana	424	600	127	35000	15
Media	424,3125	565,0606061	156,8484848	150118,04	14,09090909
Max	1023	1297	526	750000	23
sd	248,7275278	308,6701252	130,4954791	229396,5559	6,074349947

Media per categorie:

Media per categorie	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	VL basale	Anni di terapia
CT/TT	429,67	618,83	141,33	141294,67	13,50
CC	417,43	500,53	175,47	158262,69	14,80

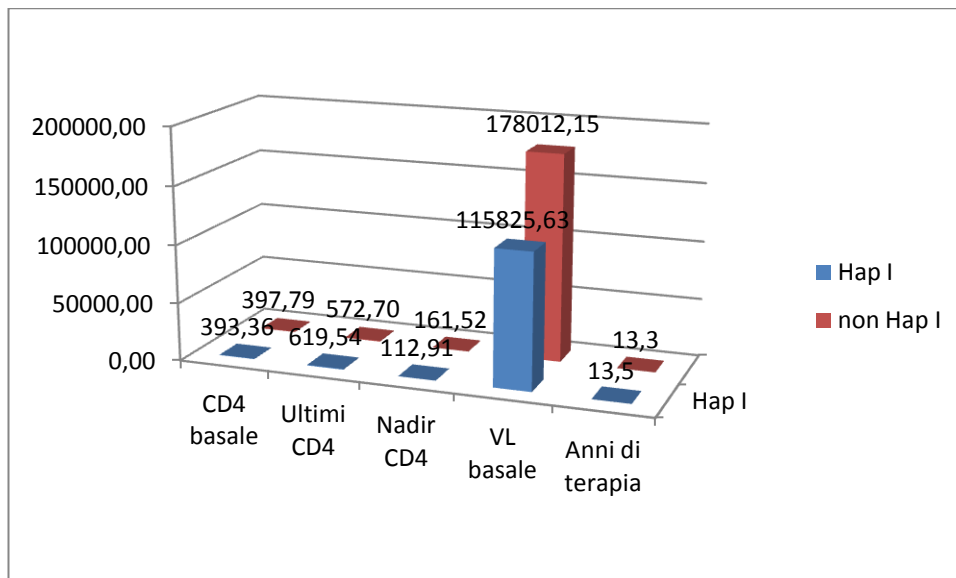


APOBEC3H Hap I:

APOBEC Hap I	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	VL basale	Anni di terapia
Min	4,00	56,00	4,00	292,00	0,00
Mediana	372,00	594,00	483,00	36056,00	14,00
Media	396,98	581,15	152,75	165574,85	13,34
Max	1060,00	1297,00	526,00	1000000,00	24,00
sd	260,17	264,54	132,24	255789,25	6,16

Media per categorie

Media per categorie	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	VL basale	Anni di terapia
Hap I	393,36	619,54	112,91	115825,63	13,5
non Hap I	397,79	572,70	161,52	178012,15	13,3

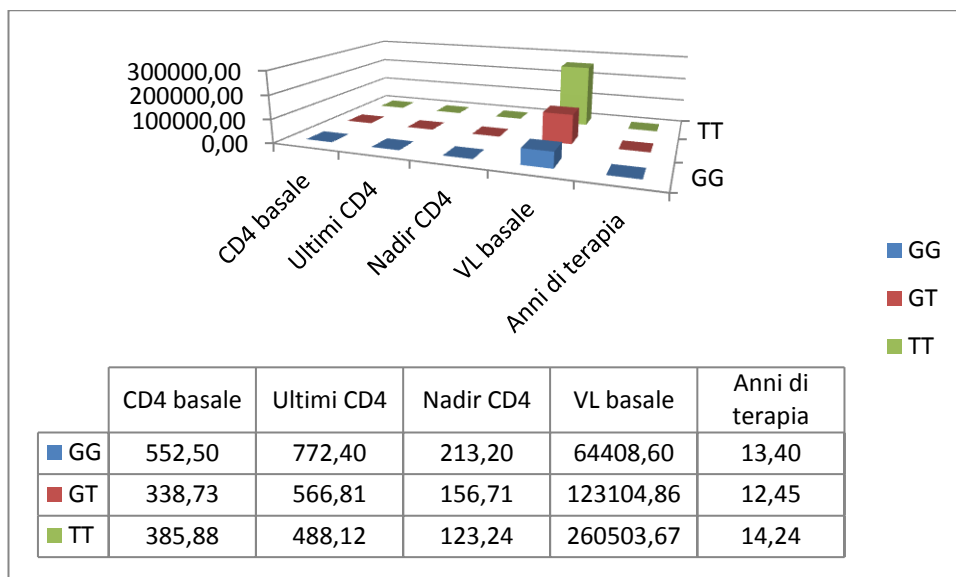


ERAP2 rs2549782:

ERAP2 rs2549782	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	VL basale	Anni di terapia
Min	4	27	4	292	0
Mediana	369	585,5	124	30936	14
Media	390,2982456	579,1896552	156,637931	157856,2564	13,13793103
Max	1060	1297	526	1000000	24
sd	260,0760167	269,5578873	132,7421585	261178,3946	6,356232681

Media per categorie

Media per categorie	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	VL basale	Anni di terapia
GG	552,50	772,40	213,20	64408,60	13,40
GT	338,73	566,81	156,71	123104,86	12,45
TT	385,88	488,12	123,24	260503,67	14,24

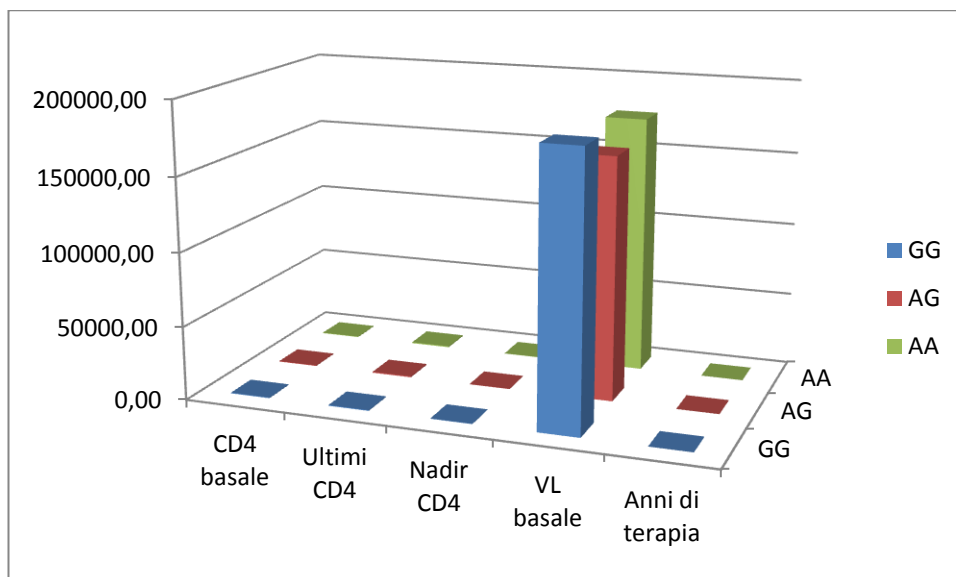


MX2 rs2074560

MX2 rs2074560	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	VL basale	Anni di terapia
Min	5,00	27,00	5,00	520,00	0,00
Mediana	321,00	619,50	128,00	31000,00	11,00
Media	370,15	626,34	166,93	172054,59	11,61
Max	1060,00	1297,00	629,00	804598,00	23,00
sd	273,26	275,37	149,19	238279,03	6,45

Media per categorie

Media per categorie	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	VL basale	Anni di terapia
GG	422,14	462,29	189,43	184083,00	7,00
AG	389,96	644,76	156,03	164192,38	12,93
AA	324,20	657,05	174,85	175629,60	11,30

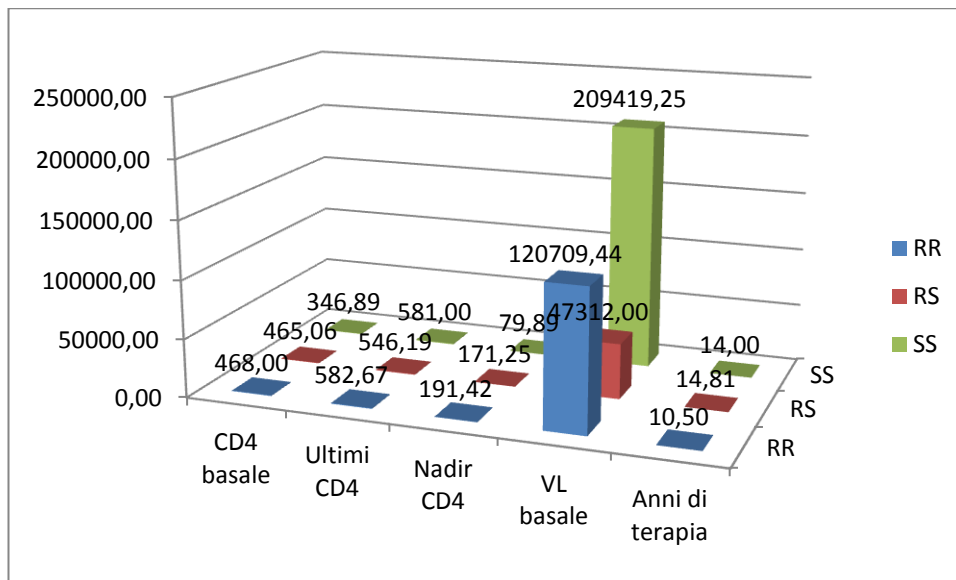


RAC2 HapT:

RAC2 Hap I	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	VL basale	Anni di terapia
Min	4,00	27,00	4,00	292,00	0,00
Mediana	437,00	592,00	127,00	22385,00	13,00
Media	437,27	566,49	155,57	114809,76	13,22
Max	1023,00	1102,00	526,00	1000000,00	24,00
sd	272,71	267,61	139,61	226407,08	6,75

Media per categorie

Media per categorie	CD4 basale	Ultimi CD4	Nadir CD4	VL basale	Anni di terapia
RR	468,00	582,67	191,42	120709,44	10,50
RS	465,06	546,19	171,25	47312,00	14,81
SS	346,89	581,00	79,89	209419,25	14,00

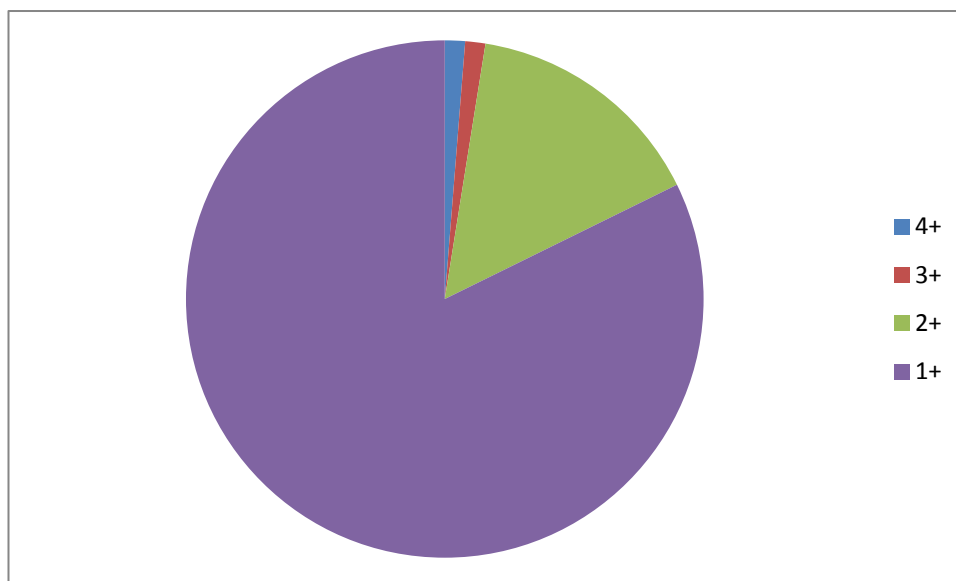


3. Creazione e confronto di quattro sottogruppi compresi nella coorte HIV+:

Una volta associati i genotipi dei pazienti arruolati con le caratteristiche cliniche e dopo avere cercato un'eventuale relazione tra andamento clinico e singola caratteristica genetica, abbiamo tentato di mettere in relazione le stesse caratteristiche con un "super genotipo", risultato della presenza nello stesso paziente di uno o più genotipi protettivi. Per fare ciò, i soggetti sono stati divisi in quattro gruppi a seconda della presenza di uno o più alleli/aplotipi protettivi. Successivamente sono state eseguite le stesse analisi di descrittive univariate e bivariate eseguite per i singoli geni. Ancora una volta per i calcoli statistici ed i relativi grafici è stato utilizzato il programma "R".

Il risultato di questo raggruppamento è quello che segue:

Numero all/aplot. protettivi	Numero di soggetti	Soggetti deceduti
4 alleli/aplotipi protettivi (4+)	1	0
	1,26%	
3 alleli/aplotipi protettivi (3+)	1	0
	1,26%	
2 alleli/aplotipi protettivi (2+)	12	3
	15,20%	
1 o nessuno alleli/aplotipi protettivi (1+)	65	1
	82,28%	4



Distribuzione delle combinazioni genetiche

- Distribuzione del sesso per combinazione genetica:

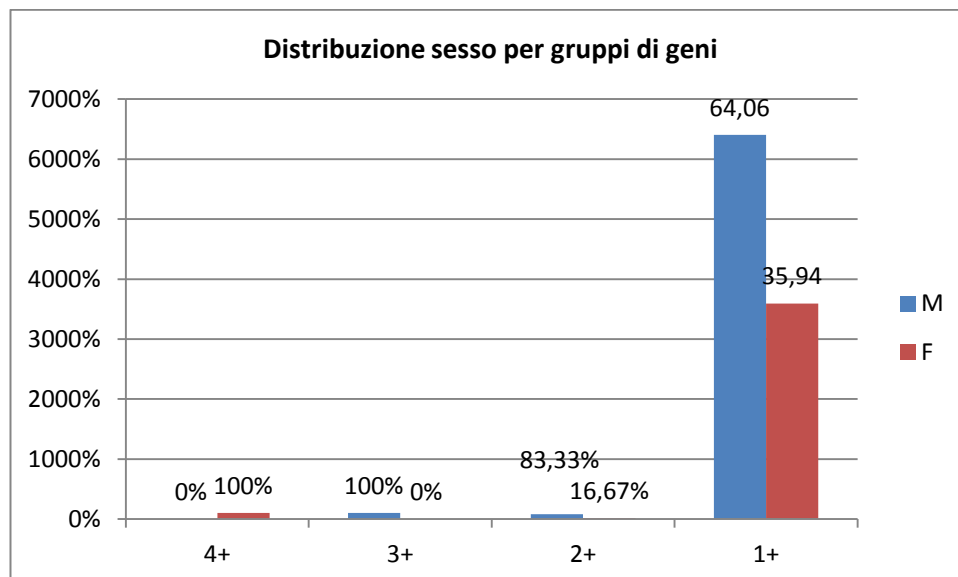
SEX	M	F	Tot
4+	0	1	1
	0%	100%	100%
3+	1	0	1
	100%	0%	100%
2+	10	2	12
	83,33%	16,67%	100%
1+	41	23	64
	64,06	35,94	100%

Chi-squared test

X-squared=4,195, df=3, p-value=0,24

Yates' chi-squared test:1,189

Yates' p-value: 0,755



- Distribuzione del fattore di rischio per combinazione genetica:

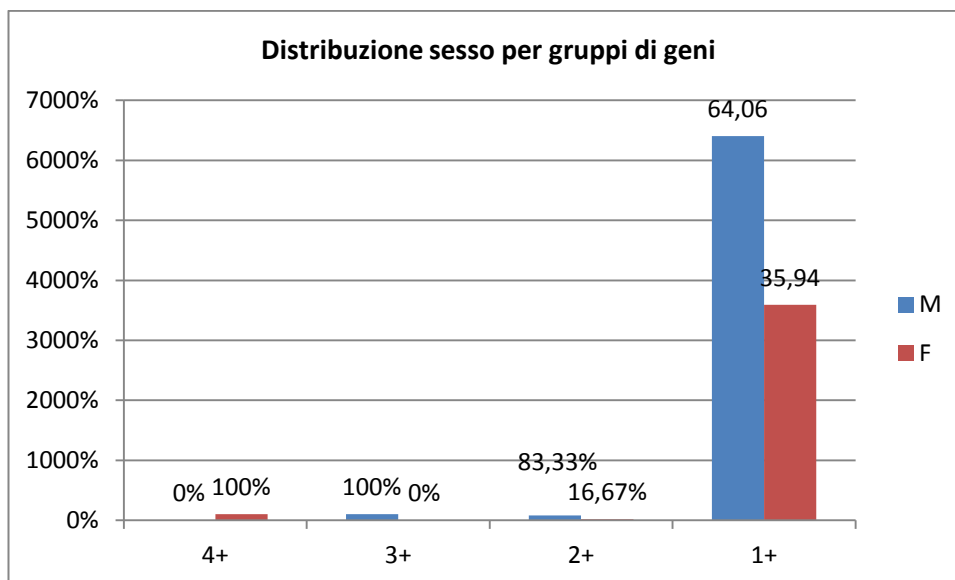
Fatt Rischio	4+	3+	2+	1+	Tot
IDU	0	1	2	29	32
	0%	3,125	6,25	96,625	100%
EteroSex	1	0	6	28	35
	2,86%	0%	17,14%	80%	100%
HomoSex	0	0	2	5	7
	0%	0%	28,53%	71,42%	100%
Bisex	0	0	2	3	5
	0%	0%	40%	60%	100%

Chi-squared test

X-squared=8,044, df=9, p-value=0,529

Yates' chi-squared test:12,245

Yates' p-value: 0,199



- Distribuzione del periodo di infezione per combinazione genetica:

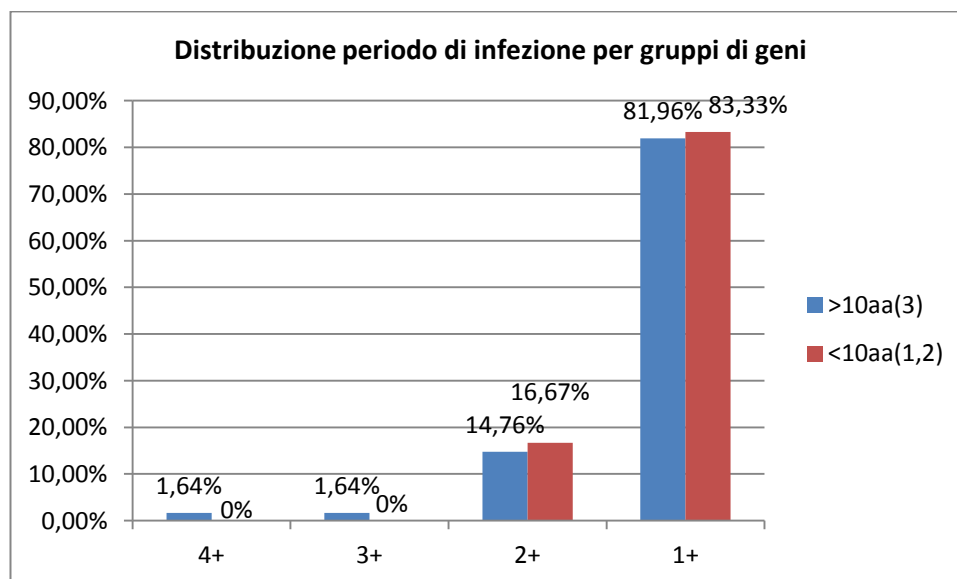
Inf.HIV	4+	3+	2+	1+	Tot
>10aa(3)	1	1	9	50	61
	1,64%	1,64%	14,76%	81,96%	100%
<10aa(1,2)	0	0	3	15	18
	0%	0%	16,67%	83,33%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,627, df=3, p-value=0,809

Yates' chi-squared test:0,876

Yates' p-value: 0,831



- Distribuzione dei pazienti attualmente con linfociti CD4+ >500num/mm³ per combinazione genetica:

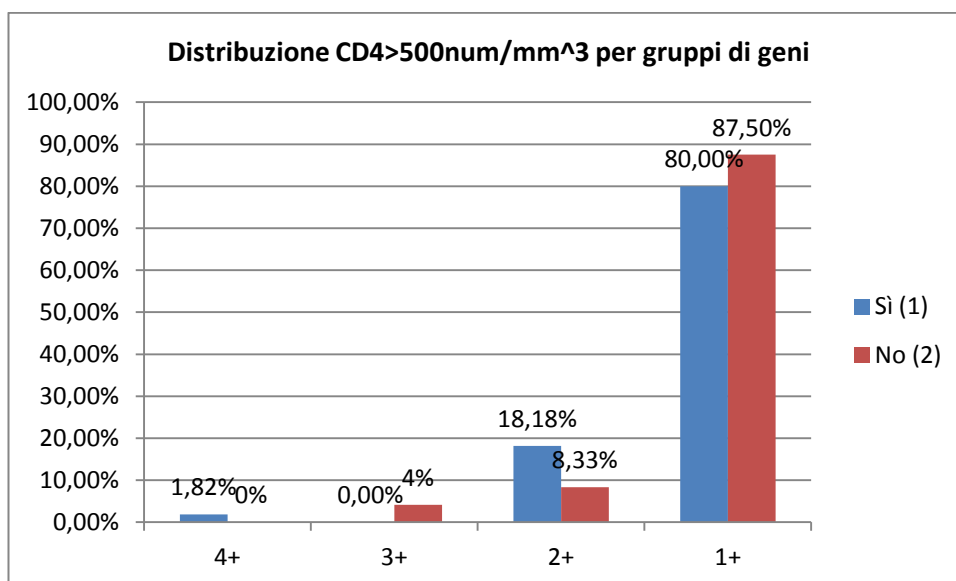
CD4>500	4+	3+	2+	1+	Tot
Sì (1)	1	0	10	44	55
	1,82%	0,00%	18,18%	80,00%	100%
No (2)	0	1	2	21	24
	0%	4%	8,33%	87,50%	100%

Chi-squared test

X-squared=3,909, df=3, p-value=0,271

Yates' chi-squared test:0,922

Yates' p-value: 0,820



- Distribuzione della attuale carica virale plasmatica non rilevabile (VL undetected) per combinazione genica:

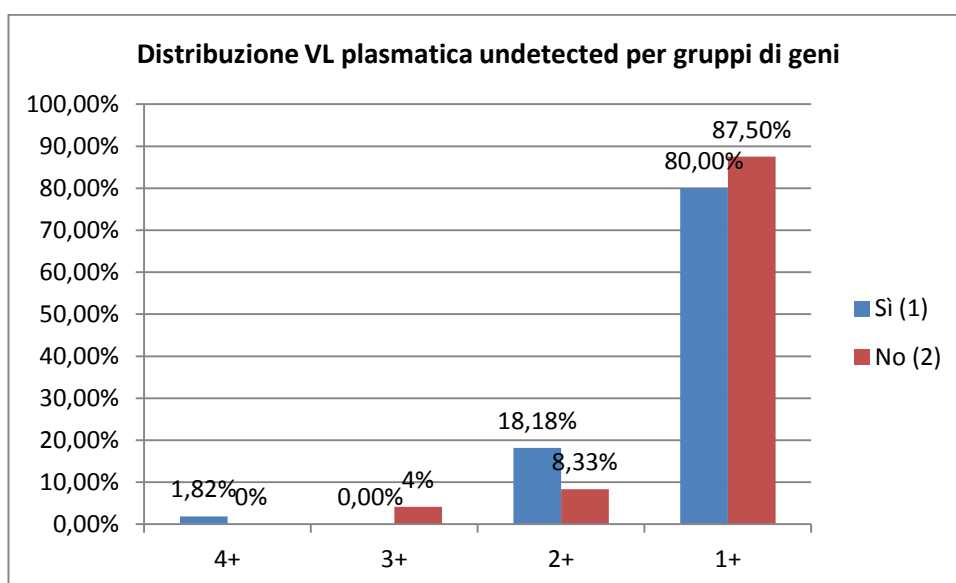
VL Undet.	4+	3+	2+	1+	Tot
Sì (1)	1	0	10	44	55
	1,82%	0,00%	18,18%	80,00%	100%
No (2)	0	1	2	21	24
	0%	4%	8,33%	87,50%	100%

Chi-squared test

X-squared=3,909, df=3, p-value=0,271

Yates' chi-squared test:0,922

Yates' p-value: 0,820



- Distribuzione del tempo di soppressione della carica virale plasmatica in presenza di terapia per combinazione genica:

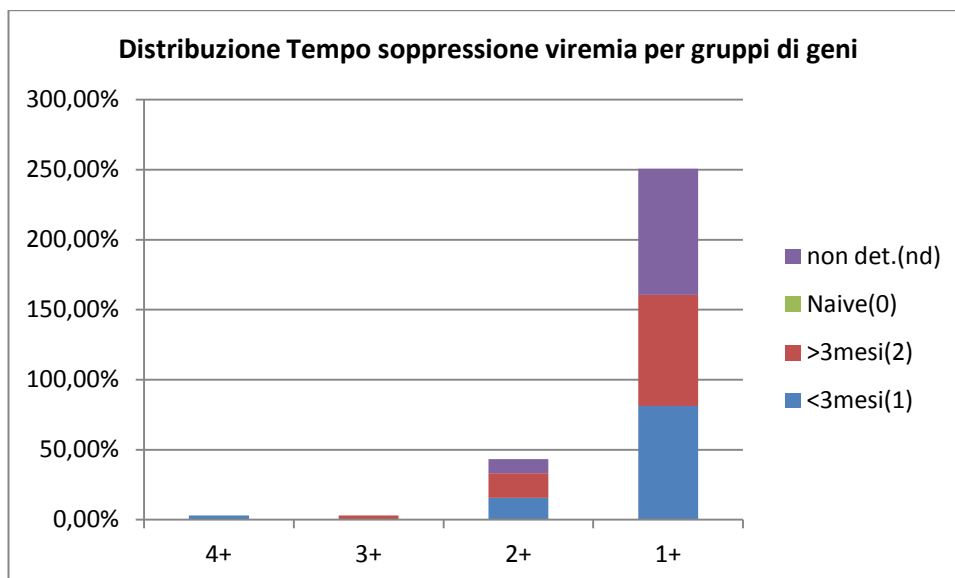
T Soppres.	4+	3+	2+	1+	Tot
<3mesi(1)	1	0	5	26	32
	3,13%	0,00%	15,63%	81,24%	100%
>3mesi(2)	0	1	6	27	34
	0,00%	2,94%	17,64%	79,42%	100%
Naive(0)	0	0	0	3	3
	0,00%	0,00%	0,00%		100%
non det.(nd)	0	0	1	9	10
	0,00%	0,00%	10%	90%	100%

Chi-squared test

X-squared=3,789, df=9, p-value=0,924

Yates' chi-squared test:13,584

Yates' p-value: 0,137



- Distribuzione dell'evoluzione clinica per combinazione genica:

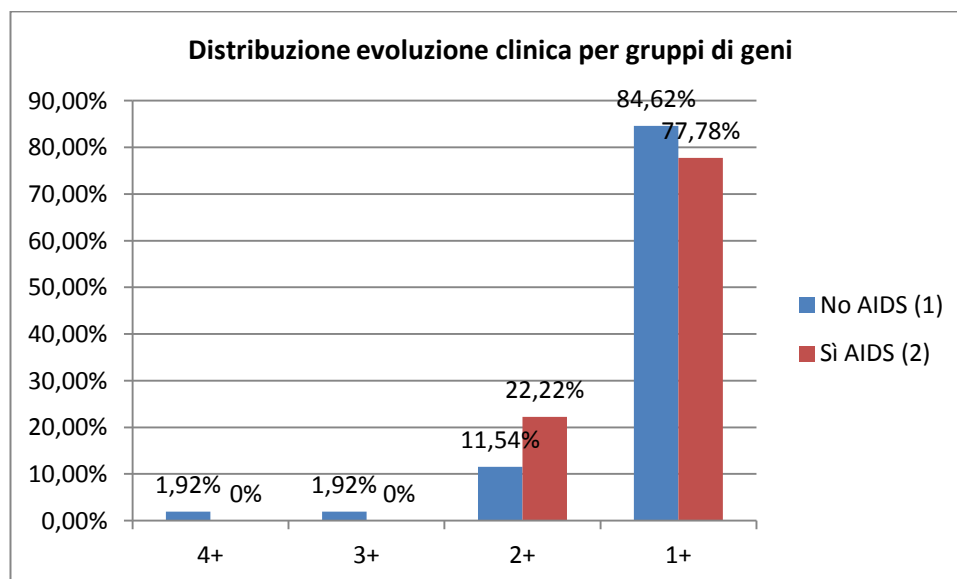
Evol.Clin	4+	3+	2+	1+	Tot
No AIDS (1)	1	1	6	44	52
	1,92%	1,92%	11,54%	84,62%	100%
Sì AIDS (2)	0	0	6	21	27
	0%	0%	22,22%	77,78%	100%

Chi-squared test

X-squared=2,475, df=3, p-value=0,479

Yates' chi-squared test:0,982

Yates' p-value: 0,805



- Distribuzione dell' assunzione di terapia HAART per combinazione genica:

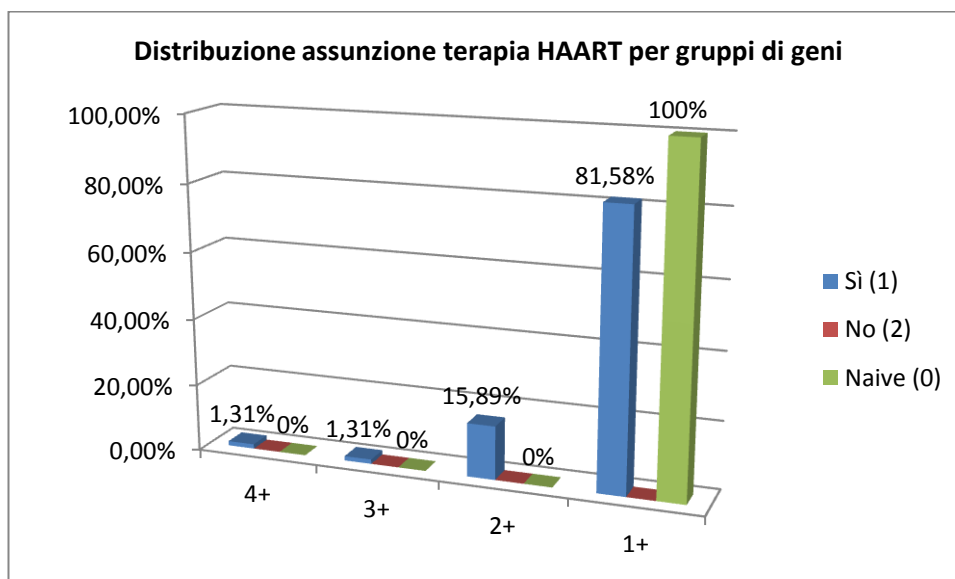
Ter.HAART	4+	3+	2+	1+	Tot
Si (1)	1	1	12	62	76
	1,31%	1,31%	15,89%	81,58%	100%
No (2)	0	0	0	0	0
					100%
Naive (0)	0	0	0	3	3
	0%	0%	0%	100%	100%

Chi-squared test

X-squared=0,672, df=3, p-value=0,879

Yates' chi-squared test:11,691

Yates' p-value: 0,008



- Distribuzione dell'aderenza alla terapia HAART per combinazione genica:

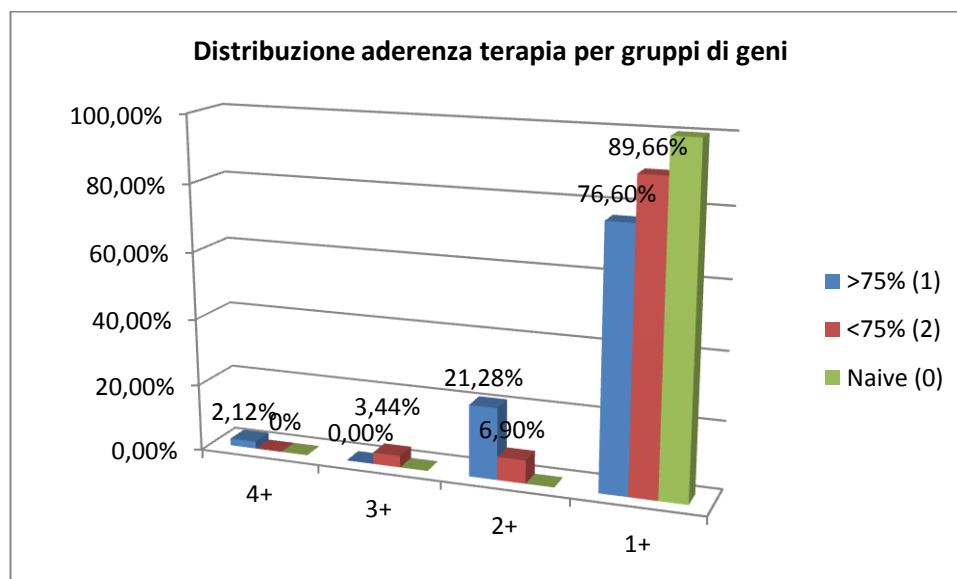
Aderenza	4+	3+	2+	1+	Tot
>75% (1)	1	0	10	36	47
	2,12%	0,00%	21,28%	76,60%	100%
<75% (2)	0	1	2	26	29
	0%	3,44%	6,90%	89,66%	100%
Naive (0)	0	0	0	3	3
	0%	0%	0%	100%	100%

Chi-squared test

X-squared=5,811, df=6, p-value=0,446

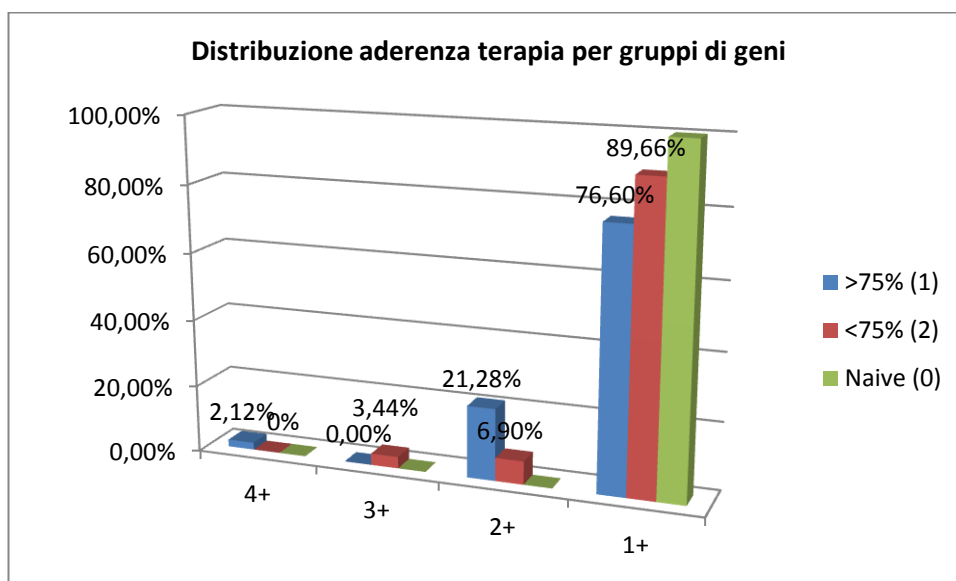
Yates' chi-squared test:13,213

Yates' p-value: 0,0397



Media per categorie:

	4+	3+	2+	1+
CD4 basale	1023	1060	410,58	344,21
Ultimi CD4	781	442	627,42	582,75
Nadir CD4	417	392	186,33	145,13
VL basale	nd	22000	163096	163520,5
Anni di terapia	9	2	13	12,5



Discussione, Conclusioni, Prospettive Future:

La ricerca su HIV si è sviluppata su molti fronti evidenziando caratteristiche morfologiche e funzionali del virus, ponendo l'attenzione su rapporto virus-ospite e sulle alterazioni che l'entrata del virus provoca nel paziente. In questo ambito si inserisce lo studio dei sistemi di difesa montati dall'ospite in presenza del virus. La reazione immunitaria contro HIV è composta e complicata: entrano in gioco molti fattori appartenenti al virus e all'ospite e le differenze tra i vari soggetti non sono trascurabili. Proprio alla luce di questo aspetto sono stati identificati gruppi di soggetti con una risposta virus specifica peculiare capace di bloccare l'evoluzione dell'infezione per molti anni. Tra questi pazienti definiti "Long Terminal Non Responder" (LTNR), vi è un ulteriore gruppo detto "Elite Controller" che, oltre ad un valore di linfociti CD4+ nella norma, presenta livelli plasmatici di HIV RNA molto bassi anche a distanza di molti anni dall'infezione. Successivamente, individui che nonostante le ripetute esposizioni al virus non presentano infezione da HIV, sono stati definiti HESN.

Con il progredire degli studi sul genoma umano sono stati identificati loci che comprendono geni in grado di modulare la secrezione di citochine e di altri mediatori della risposta immune, oltre alla presentazione antigenica. Questi aspetti vengono esaminati nello studio e la caratterizzazione della risposta immunitaria contro agenti infettivi virali. Lo scopo di tale ricerca è quello di individuare quali geni sono coinvolti nel meccanismo di risposta contro HIV, quali siano le varianti genetiche che conferiscono una migliore capacità di difesa dell'ospite e individuare, basandosi sui dati ricavati dallo studio dei soggetti HESN, la ragione per la quale alcuni soggetti sono

naturalmente resistenti all'infezione, mentre altri contraggono il virus e hanno un decorso di malattia infausto.

Come abbiamo già esposto nella sezione "Scopo della ricerca", intento di questo lavoro è quello di evidenziare eventuali correlazioni tra il polimorfismo dei cinque geni presi in esame e l'andamento dell'infezione in pazienti HIV positivi, di paragonare la frequenza delle varianti protettive di tali geni nella coorte di HIV+ e una coorte di individui HESN e, infine di determinare una correlazione tra queste varianti e i pazienti HIV+ raggruppati in funzione del numero di varianti protettive presenti. I quattro gruppi che sono stati creati comprendono soggetti con un massimo di quattro varianti protettive, fino ad un minimo di una sola variante o nessuna. Quest'ultimo gruppo è stato così formato per poter considerare anche la variabile delle genotipizzazioni che non sono andate a buon fine.

Dai dati illustrati nella sezione "Risultati" e dalla loro elaborazione statistica sono state determinate le frequenze delle quattro varianti protettive nella coorte di soggetti HESN e di soggetti HIV+ e viene mostrato che nel gruppo degli esposti sieronegativi il 30,70% dei pazienti possiede due varianti protettive, mentre il 69,30% ne possiede una o nessuna. Nella coorte dei pazienti HIV+ l'1,26% dei soggetti quattro varianti protettive, un altro 1,26% ne possiede 3, il 15,20% ne possiede due, l'82,28% una o nessuna. Poiché il valore 1,26% è dato dalla presenza di un solo paziente per gruppo, non è possibile, allo stato attuale, asserire che la frequenza delle varianti protettive è maggiore nel gruppo HIV+. Ciò è dovuto anche al fatto che non sempre la genotipizzazione è stata possibile e la combinazione è data da varianti differenti.

Successivamente, abbiamo cercato di determinare se sia presente un legame tra varianti genotipiche e dati clinici dei pazienti HIV+. Attraverso lo studio delle descrittive bivariate sono stati calcolati Chi Quadro e p-value per ogni singolo gene in relazione ai dati clinici e come fattore di normalizzazione è stato calcolato anche il Chi Quadro e il p-value di Yates in modo da poter determinare il grado di indipendenza dei valori che descrivono lo stato clinico del paziente dal genotipo o aplotipo di volta in volta considerato. I dati ottenuti mostrano per tutte le variabili genetiche un p-value che supera il 5% per ognuna delle descrittive bivariate tranne per la variante GG/GT di TLR3 rs 3775291 in funzione del sesso del paziente ($p=0,02$) e per l'evoluzione clinica in funzione della variante GG di rs2549782 del gene ERAP2 ($p=0,01$). In questi due casi perciò l'ipotesi di un legame tra sesso femminile e genotipo GG/GT di TLR3 ed assenza di evoluzione clinica e genotipo GG di ERAP2 non può essere rifiutata. Allo stesso tempo, il numero dei soggetti è piccolo per poter accettare l'ipotesi senza ulteriori verifiche.

Per quanto riguarda l'analisi del grado di indipendenza dei dati clinici dal numero di geni protettivi che possiede il paziente, è stato determinato un p-value superiore al 5% per ognuna delle descrittive analizzate tranne l'assunzione della terapia HAART e l'aderenza alla terapia stessa per le quali il p-value di Yates è inferiore al 5%. Lo stesso dato era stato riscontrato per APOBEC3H dove il calcolo del grado di indipendenza del sesso del paziente in funzione dell'aplotipo I aveva dato un p-value inferiore a 0,05 nell'elaborazione classica, ma nella normalizzazione di Yates il p-value risulta superiore al 5%. Poiché il numero delle osservazioni effettuate è in tutti e tre i casi inferiore a 100, la correzione di Yates per la continuità è da preferire perciò mentre l'ipotesi di indipendenza tra sesso e Hap I non può essere rifiutata, la probabilità di

un legame tra numero di genotipi protettivi e assunzione di terapia e aderenza alla stessa può essere considerata probabile.

E' stata eseguita anche l'analisi delle univariate "CD4 basale", "Nadir CD4", "VL basale", "Ultimi CD4", "Anni di terapia" per ogni genotipo e aplotipo preso in esame e per i quattro gruppi di geni protettivi. Dopo aver calcolato la media per ogni categoria in funzione del genotipo/aplotipo sono stati tracciati i grafici.

Dall'osservazione di questi ultimi è possibile evidenziare una somiglianza degli istogrammi.

Alla luce dei dati riportati, è necessario ribadire come questo lavoro sia l'inizio di un'indagine che mira a cercare non solo la presenza o meno di una variante genetica protettiva che renda resistente all'infezione un individuo HESN e migliori la condizione clinica di un sieropositivo, ma tenta di capire se esista una combinazione tra varianti più efficace di un'altra. Questo tipo di indagine è resa oramai necessaria dal concetto che da una parte il "vantaggio immunologico" che rende resistenti all'infezione da HIV e dall'altra il progredire della malattia sono il risultato di una sommatoria di caratteristiche genetiche, che apportano contributi diversi al fenotipo risultante. Le difficoltà incontrate che rappresentano i limiti di questa ricerca preliminare sono il numero piccolo di soggetti esaminati, le differenze nella genotipizzazione eseguita (per cui non tutti i soggetti hanno gli stessi geni caratterizzati), la mancanza di un campione di controlli sani.

Le variabili individuali, come per esempio la sfera psicologica che riveste nel caso di un paziente sieropositivo un ruolo non marginale, e l'estrema diversità dei soggetti possono impattare sui risultati ottenuti. Inoltre non

possiamo dimenticare che la terapia HAART può creare interferenze con la risposta immunitaria e con la carica virale plasmatica.

Alla luce di queste considerazioni, per una maggiore comprensione di questi aspetti risultano necessari ulteriori studi che mirino a :

- Uniformare le due coorti: aumentando il numero di soggetti esaminati, genotipizzando gli stessi loci e creando un modello di regressione lineare.
- Aumentare ulteriormente il numero di variabili: includendo nello studio altri geni coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria HIV-specifica e altre caratteristiche come ad esempio la risposta immunitaria umorale. Infatti anche negli individui HESN è possibile rilevare a livello delle mucose (che sono la prima barriera difensiva all'entrata del virus) IgA HIV-specifiche e anticorpi neutralizzanti virus specifici in assenza di IgG anti-HIV e acido nucleico virale.

Bibliografia:

1. Deng H, Liu R, Ellmeier W et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 381, 661-666(1996).
2. Samson M, Libert F, Doranz BJ et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 382(6593), 722-725 (1996).
3. Hütter G, Nowak D, Mossner M et al. Long-term control of HIV by CCR5 Delta 32/Delta32 stem-cell transplantation. *N.Engl.J.Med.* 360 (7), 692-698 (2009).
4. Draenert R, Allen TM, Liu Y et al. Constraints on HIV-1 evolution and immunodominance revealed in monozygotic adult twins infected with the same virus. *J. Exp. Med.* 203(3), 529-539 (2006).
5. Inagawa DT, Lee MH, Wolinsky SM et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. *N. Engl. J. Med.* 320, 1458-1462(1989).
6. Clerici M, Giorgi JV, Chou CC et al. Cell-mediated immune responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. *J. Infect. Dis.* 165: 1012-1019 (1992).
7. Plummer F, Fowke K, Nagelkerke NJ et al. Evidence for resistance to HIV among continuously exposed prostitutes in Nairobi, Kenya. Presented at :9th International AIDS Conference / 4th STD World Congress; Berlin, Germany. Abstract WA-A07-3 (1993).
8. Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J et al. resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet*, 348, 1347-1351 (1996).

9. Miyazawa M, Lopalco L, Mazzotta F et al. The “immunologic advantage” of HIV-exposed sieronegative individuals. *AIDS*. 23(2): 161-75 (2009).
10. Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML et al. Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study Infection Disease Clinical research Program (IDCRP) HIV Working Group. *J Infect Dis*.200(11), 1714-1723(2009).
11. Mikhail M, Wang B, Saksena NK. Mechanism involved in non-progressive HIV disease. *AIDS Rev*. 5(4), 230-244(2003).
12. Pantaleo G, Fauci AS.Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol*. 50, 825-854 (1996).
13. Piacentini L, Biasin M, Fenizia C et al. Genetic correlates of protection aganist HIV infection: the ally within. *J Intern Med*. 265, 110-124 (2009).
14. Baker BM, Block BL, Rotchild AC et al. Elite control of HIV infection: implications for vaccine design. *Expert Opin Biol Ther*. 9(1), 55-69(2009)
15. Madec Y, Boufassa F, Porter K et al. Spontaneous control of viral load and CD4 cell count progression among HIV-1 seroconverters. *AIDS*. 19, 2001-2007(2005).
16. Hunt PW, natural control of HIV-1 replication and long-term nonprogression:overlapping but distinct phenotypes. *J Infect Dis*. 200,1636-1638 (2009).
17. O’Brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS. *Nat Genet* 36(6), 565-574 (2004).
18. Shea PR, Shianna KV, Carrington M et al. Host genetics of HIV acquisition and viral control. *Annu Rev. Med* (2012).

19. An P, Winkler CA. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. *Trends Genet.* 26(3), 119-131 (2010).
20. Neefjes J, Jongstra ML, Paul P et al. Towards a systems understanding of MHC class I and class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11 (12),823-836 (2011).
21. Blacwell JM, Jamieson SE, Burgner D. HLA and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 22(2), 370-385 (2009).
22. Goulder PJ, Watkins DI. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat Rev Immunol.* 8(8), 619-630(2008).
23. Carrington M, O'Brien SJ. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med.* 54,535-551 (2003).
24. Boutwell CL, Rowley CF, Essex M. Reduced viral replication capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtype C caused by cytotoxic-T-Lymphocyte escape mutations in HLA-B57 epitopes of capsid protein. *J Virol.* 83(6),2460-2468(2009).
25. Klein MR, Van der Burg SH, Hovenkamp E et al. Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J Gen Virol.* 79,2191-2201(1998).
26. Goulder PJ, Bunce M, Krausa P et al. Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 12, 1691-1698(1996).
27. Gillepsie GM, Kaul R, Dong T et al. Cross-reactive cytotoxic T lymphocytes against a HIV-1 p24 epitope in slow progressors with B*57. *AIDS.*16,961-972(2002)

28. Makadzange AT, Gillepsie G, Kimani J et al. Identification of a novel HLA B*57 restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope within HIV-1 rev. *AIDS*.20(3), 462-464(2006).
29. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA et al. Late escape from immunodominant cytotoxic T-Lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 3, 212-217(1997).
30. Kelleher AD, Long C, Holmes EC et al. Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*. 193,375-386 (2001).
31. Schneidewind A, Brockman Ma, Yang R et al. Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol*. 81(22),12382-12393 (2007).
32. Gao X, Nelson GW, Karacki P et al. Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med*. 344(22), 1668-1675 (2001).
33. Carrington M, Nelson GW, Martin MP et al. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science*. 283, 1748-1752 (1999).
34. Huang J, Goedert JJ, Sundberg EJ et al. HLA-B*35-Px-mediated acceleration of HIV-1 infection by increased inhibitory immunoregulatory impulses. *J Exp Med*. 206(13), 2959-2966 (2009).
35. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE et al. Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis*. 197 (4), 563-571 (2008).
36. O'Connell KA, Bailey JR, Blankson JN. Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol Sci*. 30(12), 631-637 (2009).

37. MacDonald KS, Embree J, Njenga S et al. Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type I transmission. *J Infect Dis.* 177(3), 551-556 (1998).
38. Mackelprang RD, John-Stewart G, Carrington M et al. Maternal HLA homozygosity and mother-child HLA concordance increase the risk of vertical transmission of HIV-1. *J Infect Dis.* 197(8), 1156-1161 (2008).
39. Cagliani R, Riva S, Biasin M et al. Genetic diversity at endoplasmic reticulum aminopeptidases is maintained by balancing selection and is associated with natural resistance to HIV-1 infection. *Hum Mol Genet.* 19(23), 4705-4714 (2010).
40. Andres AM, Dennis MY, Kretzschmar WW et al. Balancing selection maintains a form of ERAP2 that undergoes nonsense-mediated decay and affects antigen presentation. *PloS Genet.* 6(10), e1001157 (2010).
41. Jamil KM, Khakoo SI. KIR/HLA interactions and pathogen immunity. *J Biomed Biotechnol.* 2011:298348 (2011).
42. Jennes W, Verheyden S, Demant C et al. Cutting edge: resistance to HIV-1 infection among African female sex workers is associated with inhibitory KIR in the absence of their HLA ligands. *J Immunol.* 15;177(10):6588-6592 (2006).
43. Guerrini FR, Lo Caputo S, Gori A et al. Under representation of the inhibitory KIR3DL1 molecule and the KIR3DL1+/BW4* complex in HIV exposed seronegative individuals. *J Infect Dis.* 203(9):1235-1239 (2011).
44. Carrington M, Martin MP, Van Bergen J et al. KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Review* 16(12):620-7. 29 (2008).
45. Pelak K, Need AC, Fellay J et al. Copy number variation of KIR genes influences HIV-1 control. *PLoS Biol.* 9(11): e1001208 (2011).

46. Yang C, Li M, Limpakarnjanarat K et al. Polymorphism in the CCR5 coding and non-coding regions among HIV type 1-exposed, persistently seronegative female sex workers from Thailand. *AIDS Res Hum Retrovir.*19:661-665(2003).
47. Louisirirochanakul S, Liu H, Roongpisuthipong A et al. Genetic analysis of HIV-1 discordant couples in Thailand: association of CCR2-64I homozygosity with HIV-1-negative status. *J. Acquir Immune Defic Syndr.* 29: 314-315((2002).
48. Verma R, Gupta RB, Singh K, Bhasin R et al. Distribution of CCR5delta32, CCR2-64I and SDF1-3'A and plasma levels of SDF-1 in HIV-1 seronegative North Indians. *J Clin Virol.* 38(3):198-203(2007).
49. Soriano A, Martinez C, Garcia F et al. Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-30A genotype and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression. *J Infect Dis.* 186: 922-931(2002).
50. Gonzales E, Kulkarni H, Bolivar H et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV/AIDS susceptibility. *Science.* 307:1434-1440(2005).
51. Pilotti E, Elviri L, Vicenzi E et al. Postgenomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2-infected persons curtails HIV-1 replication. *Blood.* 109:1850-1856(2007).
52. Urban TJ, Weintrob AC, Fellay J et al. CCL3L1 and HIV/AIDS susceptibility. *Nat Med* 15(10):1110-2(2009).
53. Field SF, Howson JM, Maier LM et al. Experimental aspects of copy number variant assays at CCL3L1. *Nat Med.* 15(10):1115-1117(2009)
54. Bhattacharya T, Stanton J, Kim EY et al. CCL3L1 and HIV/AIDS susceptibility. *Nat Med.* 15(10): 1112-1115(2009).

55. Wu L, LaRosa G, Kassam N et al. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and single domain for chemokine binding. *J Exp Med.* 186:1373-1381(1997).
56. Kanari Y, Clerici M, Abe H et al. Genotypes at chromosome 22q12-13 are associated with HIV-1 exposed but uninfected status in Italians. *AIDS.* 19(10):1015-1024(2005).
57. Biasin M, Piacentini L, Lo Caputo S et al. APOBEC3G: A possible role in the resistance to HIV-1 of HIV-Exposed-Seronegative Individuals. *J Infect Dis,* 195:960-964(2007).
58. Ross S, Are viruses inhibited by APOBEC3 molecules from their host species? *PLoS Pathog.* 5(4): e1000347.(2009).
59. Jin X, Wu H, Smith H. APOBEC3G levels predict rates of progression to AIDS. *Retrovirology.* 4:20(2007).
60. Vasquez-Perez JA, Ormsby CE, Hernandez-Juan R et al. APOBEC3G mRNA expression in exposed seronegative and early stage HIV infected individuals decreases with removal of exposure and with disease progression. *Retrovirology.* 6:23(2009).
61. Reddy K, Winkler CA, Werner L et al. APOBEC3G expression is dysregulated in primary HIV-1 infection and polymorphic variants influence CD4+ T-cell counts and plasma viral load. *AIDS.* 24(2):195-204(2010).
62. An P, Bleiber G, Duggal P et al. APOBEC3G genetic variants and their influence on the progression to AIDS. *J Virol* 78(20):11070-11076(2004).
63. Bunupuradah T, Imahashi M, Iampornsinsin T et al. Association of APOBEC3G genotypes and CD4 decline in Thai and Cambodian HIV-

infected children with moderate immune deficiency. *AIDS Res Ther* 9 (1):34(2012).

64. Valcke HS, Bernard NF, Bruneau J et al. APOBEC3G genetic variants and their association with risk of HIV infection in highly exposed caucasians. *AIDS* 20(15): 1984-1986 (2006).

65. Cagliani R, Riva S, Fumagalli M et al. A positively selected APOBEC3H haplotype is associated with natural resistance to HIV-1 infection. *Evolution* 65(11):3311-3322(2011).

66. Lukic Z, Campbell EM. The cell biology of TRIM5 α . *Curr HIV/AIDS Rep*9(1):73-80.(2012).

67. Van Manen D, Rits MA, Beugeling C et al. The effect of Trim5 polymorphism on the clinical course of HIV-1 infection. *PloS Pathog.* 4(2): e 18(2008).

68. Speelman EC, Livingston-Rosanoff D, Li SS et al. genetic association of the antiviral restriction factor TRIM5 α with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 80:2463-2471(2006).

69. Javanbakht H, An P, Gold B et al. Effects of human TRIM5 α polymorphisms on antiretroviral function and susceptibility to human immunodeficiency virus infection. *Virology* 354: 15-27(2006).

70. Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G et al. Impact of novel TRIM5 α variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS* 23(16): 2091-2100(2009).

71. Van Manen D, Rits MA, Beugeling C et al. The effect of TRIM5 polymorphisms on the clinical course of HIV-1 infection. *PLoS Pathog* 4: e18(2008).

72. Biasin M, Piacentini L, Lo Caputo S et al. TLR activation pathways in HIV-1-exposed seronegative individuals. *J Immunol.* 184(5): 2710-2717(2010).

73. Sironi M, Biasin M, Cagliani R et al. A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection. *J Immunol* 188(2): 818-823(2012).
74. Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet.* 13(3), 175-188 (2012).
75. Fellay J, Shianna KV, Ge D et al. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science.* 371(5840), 944-947 (2007).
76. Migueles SA, Sabbaghian MS, Shupert WL et al. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97(6), 2709-2714(2000).
77. Altfeld M, Addo MM, Rosenberg ES. Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection. *AIDS.* 17(18), 2581-2591(2003).
78. Stranger BE, Forrest MS, Clark AG et al. Genome-wide associations of gene expression variation in humans. *PLoS Genet.* 1(6), e78(2005).
79. Van Manen D, Delaneau O, Kootstra NA et al. Genome-wide association scan in HIV-1-infected individuals identifying variants influencing disease course. *PLoS One.* 6(7), e22208 (2011).
80. Fellay J, Ge D, Shianna KV et al. Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. *PLoS Genet* 5(12), e1000791(2009).
81. Pelak K, Goldstein DB, Walley NM et al. Host determinants of HIV-1 control in Afro Americans. *J Infect Dis.* 201(8), 1141-1149(2010).
82. International HIV Controllers Study, Pereyra F, Jia X, McLaren PJ et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science.* 330(6010), 1551-1557(2010).

83. Telenti A, Johnson WE. Host genes important to HIV replication and evolution. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(4), a007203(2012).
84. Bol SM, Moerland PD, Limou S et al. Genome-wide association study identifies single nucleotide polymorphism in DURK1A associated with replication of HIV-1 in monocytes-derived macrophages. *PLoS One* 6(2), e17190(2011).
85. Limou S, Coulonges C, Herbeck JT et al. Multiple-cohort genetic association study reveals CXCR6 as a new chemokine receptor involved in long-term nonprogression to AIDS. *J Infect Dis.* 202(6), 908-915 (2010).
86. Petrovski S, Fellay J, Shianna KV et al. Common human genetic variants and HIV-1 susceptibility: a genome-wide survey in homogeneous African population. *AIDS.*25(4), 513-518 (2011).
87. Lingappa JR, Petrovski S, Kahle E et al. Genomewide association study for determinants of HIV-1 acquisition and viral set point in HIV-1 serodiscordant couples with quantified virus exposure. *PLoS One.* 6(12), e28632(2011).
88. Limou S, Delaneu O, Van Manen D et al. Multicohort genomewide association study reveals a new signal of protection against HIV-1 acquisition. *J Infect Dis.* 205(7), 1155-1162(2012).
89. Bartel DP. MicroRNAs: genomic, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116, 281-297(2004).
90. Rom S, Rom I, Passiatore G et al. CCL8/MCP-2 is a target for mir-146a in HIV-1-infected human microglial cells. *The FASEB J.* 24, 2292-2300 (2010).
91. Lee Y, Kim M, Han J et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO J.* 23, 4051-4060 (2002).

92. Lee Y, Jeon K, Lee JT et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO J.* 21, 4663-4670 (2002).
93. Han J, Lee Y, Yeom KH et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes and Development.* 18, 3016-3027 (2004).
94. Yi R, Qin Y, Macara IG et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-miRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development.* 17, 3011-3016 (2003).
95. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 136, 215-233(2009).
96. Neilson JR, Sharp PA. Small RNA regulators of gene expression. *Cell* 134, 899-902.
97. Zhang HS, Wu TC, Sang WW et al. MiR-217 is involved in tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation by down-regulation of SIRT1. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1823, 1017-1023 (2012).
98. Triboulet R, Mari B, Lin YL et al. Suppression of micro-RNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science.* 315, 1579-1582 (2007).
99. Pilakka-Kanthikeel S, Sayied ZM, Napuri JJ et al. MicroRNA: implications in HIV, a brief overview. *J Neurovirology.* 17, 416-423 (2011).
100. Klase Z, Houzet L, Jeang KT. MicroRNAs and HIV-1: Complex interactions. *The Journal of biological chemistry.* 287, 40884-40890(2012).
101. Hariharan M, Scaria V, Pillai B et al. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 337, 1214-12 (2005).

102. Huang J, Wang F, Argyris E et al. Cellular microRNAs contributes to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med* 13, 1241-1247 (2007).
103. Ahluwalia JK, Khan SZ, Soni K et al. Human cellular microRNA has-miR-29a interferes with viral nef protein expression and HIV-1 replication. *Retrovirology* 5, 117 (2008).
104. Nathans R, Chu CY, Serquina AK et al. Cellular microRNA and P bodies modulate host-HIV-1 interactions. *Molecular Cell* 34, 696-709 (2009).
105. Wang Xu, Ye W, Hou W et al. Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection. *Blood*. 113, 671-674 (2009).
106. Lewin SR, Kirihaara J, Sonza S et al. HIV-1 DNA and RNA concentrations are similar in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages in HIV-1-infected individuals. *AIDS*. 12, 719-727 (1998).
107. Houzet L, Klase Z, Yeung ML et al. The extent of sequence complementarity correlates with the potency of cellular miRNA-mediated restriction of HIV-1. *Nucleic Acid Research*.
108. Sung TL, Rice AP. miR-198 inhibits HIV-1 gene expression and replication in monocytes and its mechanism of action appears to involve repression of Cyclin T1. *PLoS Pathog*. 5, e1000263 (2009).
109. Chiang K, Sung TL, Rice AP. Regulation of Cyclin T1 and HIV-1 replication by microRNAs in resting CD4+ T lymphocytes. *J Vir*. 86, 3244-3252 (2012).
110. Shen CJ, Jia YH, Tian RR et al. Translation of Pur-alpha is targeted by cellular miRNAs to modulate the differentiation-dependent susceptibility of monocytes to HIV-1 infection. *FASEB J*. 11, 4755-4764(2012).

111. Sun G, Rossi JJ. MicroRNAs and their potential involvement in HIV Infection. *Trends in pharmacological sciences*. 32, 675-681 (2011).
112. Witwer KW, Watson AK, Blankson JN et al. Relationship of PBMC microRNA expression, plasma viral load, and CD4+ T-cell count in HIV-1-infected elite suppressors and viremic patients. *Retrovirology* 9:5. (2012).
113. Bignami F, Pilotti E, Bertoncelli L et al. Stable changes in CD4+ T-lymphocyte microRNA expression following exposure to HIV-1. *Blood*. 119, 6259-6267 (2012).
114. Coffman RL, Weissman IL. A B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* 1980, B220; 289: 681-683.
115. Dalchau R, Fabre JW. Identification with a monoclonal antibody of predominantly B lymphocyte-specific determinant of the human leukocyte common antigen. *J Exp med* 1980; 153: 753-756.
116. Reinherz EL, Schlossman SF. The differentiation of function of human T lymphocytes. *Cell* 1980; 19: 821-827.
117. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA et al. Antigen recognition by human T lymphocytes is limited to surface expression of T3 molecular complex. *Cell* 1982; 30: 735-743.
118. Meuer SC, Acuto O, Hussey RE et al. Evidence of the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. *Nature* 1983; 303: 808-810.
119. Reinherz EL, Meuer SC, Schlossman SE. The delineation of antigen receptors on human T lymphocytes. *Immunol Today* 1983; 4: 5-8.
120. Reinherz EL, Morimoto C, Fitzgerald KA et al. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. *J Immunol* 1982; 128: 463-468.

121. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA et al. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. *J Immunol* 1985; 134: 1508-1515.
122. Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA et al. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. *Eur J Immunol* 1986; 16: 198-204.
123. Meuer SC, Schlossman SF, Reinherz EL. Lonal analysis of human cytotoxic T lymphocytes: T4+ and T8+ effector T cells recognize products of different major hystocompatibility regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 4395-4399.
124. McMichael AJ, Beverly PCL, Cobbold S et al. Leukocyte typing III. Oxford University press 1987, Oxford, UK; pagg 38,40,42,43,116,167,170-172,176,199,202,206,302-308,315,475,796-801.
125. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical revelance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76: 2421-2438.
126. Barclay AN, Birkeland ML, Brown MH et al. The leukocyte antigen factsbook. Academic Press, London 1993; 106-109,142-143, 228-229.
127. Schmidt RE, Murray C, Daley JF et al. A subste of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. *J Exp Med* 1986; 164: 351-356.
128. Sironi M, Biasin M, Cagliani R et al. Evolutionary analysis identifies an MX2 haplotype associated with natural resistance to HIV-1 infection. *Mol Biol Evol* 2014; 31(9) :2042-14.
129. Bokoch G.M. Regulation of innate immunity by Rho GTPases. *TRENDS Cella Biol* 2005;15, 163-171.

Attività 2011-2014:

2011

Congresso ICAR 2011: Abstract e Poster: S. Corso, **A. Poggi**, D. Romeo, A. Alecci, S. Francolini, A. Campana, C. Bartolozzi, F. Bacherini, B. Di Giacomo, F. Polverini, S. Lo Caputo, F. Mazzotta. HIV/AIDS: una malattia dimenticata.

N. Marino, C. Blè, P. Pierotti, P. Zagli, **A. Poggi**, F. Mazzotta. HIV infection in a cohort of adult migrants. *Infection* 2011; 39 Suppl I):89,87.

2012

Attività di laboratorio presso la U.O. Malattie Infettive, O.S.M. Annunziata di Firenze.

Attività di biologa nell'ambito del progetto: "STUDIO CLINICO DI FASE II, RANDOMIZZATO, IN APERTO, PER VALUTARE L'IMMUNOGENECITA' E LA SICUREZZA DEL VACCINO BASATO SULLA PROTEINA RICOMBINANTE BIOLOGICAMENTE ATTIVA TAT DI HIV-1 IN SOGGETTI ADULTI INFETTATI DAL VIRUS HIV-1, ANTI-TAT NEGATIVI, IN TRATTAMENTO CON HAART", FINANZIATO DALL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'.

Responsabile per il centro fiorentino di S.M. Annunziata dell'aggiornamento e follow-up database "ICONA"

-Seminario tenuto dal Prof. Clerici: "Therapeutic approaches for immune activation: how to improve ART".

-Seminario tenuto dalla Prof. sa G. Franchini: "HIV vaccines: from the macaque model to humans and back".

2013, la nostra attività si è divisa tra il laboratorio e la presenza a vari congressi tra cui ricordiamo:

Attività di biologia nell'ambito del progetto: "STUDIO CLINICO DI FASE II, RANDOMIZZATO, IN APERTO, PER VALUTARE L'IMMUNOGENECITA' E LA SICUREZZA DEL VACCINO BASATO SULLA PROTEINA RICOMBINANTE BIOLOGICAMENTE ATTIVA TAT DI HIV-1 IN SOGGETTI ADULTI INFETTATI DAL VIRUS HIV-1, ANTI-TAT NEGATIVI, IN TRATTAMENTO CON HAART", FINANZIATO DALL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'.

-Congresso ICAR Torino 2013: presente con 2 abstract

S. Lo Caputo, F. Vichi, E. Ricci, **A. Poggi**, B. Del Pin, M. Biasin, F. Gnudi, A. Alecci, F. Mazzotta: Discordant Couple and HIV infection: role of cART and changing in couple behaviour

F. Saladini, A. Giannini, A. Boccuto, A. Rosi, G. Meini, I. Vicenti, A. Materazzi, **A. Poggi**, B. Del Pin, M. Di Pietro, M. Zazzi: Phenotypic characterization of an unusual Y143G integrase Mutant selected by a Raltegravir containing regimen.

-Congresso IBAT Napoli 2013, Poster: Del Pin, F. Vichi, A. Poggi, C. Blè, F. Mazzotta: Infezione di protesi vascolare da germi multi resistenti: case report.

-Intercohorts Meeting Fondazione ICONA Roma 2013(mi occupo dell'aggiornamento dei vari db del progetto iCONA)

-Congresso ANLAIDS Firenze 2013

-III Workshop Nazionale: terapie innovative delle Epatiti virali croniche
2014

Attività di biologia nell'ambito del progetto: "STUDIO CLINICO DI FASE II, RANDOMIZZATO, IN APERTO, PER VALUTARE L'IMMUNOGENECITA' E LA SICUREZZA DEL VACCINO BASATO SULLA PROTEINA RICOMBINANTE BIOLOGICAMENTE ATTIVA TAT DI HIV-1 IN SOGGETTI ADULTI INFETTATI DAL VIRUS HIV-1, ANTI-TAT NEGATIVI, IN TRATTAMENTO CON HAART", FINANZIATO DALL'ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'.

- IV Workshop Nazionale: terapie innovative delle Epatiti virali croniche

-Vincitrice della Gilead Fellowship 2014 con il progetto di ricerca: "Coppie discordanti e infezione da HIV: ruolo della terapia antiretrovirale nei cambiamenti della vita e della progettualità di coppia (DisCo COHORT)"

Ringraziamenti:

Innanzitutto ringrazio il Prof. Ceccherini che mi ha dato l'opportunità di "cimentarmi" in questo progetto veramente tanto impegnativo, ma anche tanto stimolante.

Grazie al Dr. Lo Caputo che mi ha seguito durante tutta la preparazione e la stesura di questa tesi e grazie anche alla Dr.sa Pierotti, che ricorda sempre tutto dei nostri pazienti senza dover consultare una cartella clinica.

Un ringraziamento al primario della nostra U.O., Dr. Mazzotta per i consigli e il sostegno.

E' doveroso ricordare che senza il contributo del Prof. Clerici, della prof.ssa trabattoni, della Dr.sa Biasin, Dr.sa Sironi, Dr.sa Cagliani, Dr.sa Pontremoli questa tesi non avrebbe mai visto la luce.

Grazie al mio carissimo amico biostatistico dr. Antonio Gasparrini della "London School of Hygiene & Tropical Medicine, department of Social and Environmental Health Research" per la consulenza statistica.

Infine un grazie di cuore a Tommaso e a Gionata perché stanno sempre dalla mia parte.