

**DOTTORATO DI RICERCA IN VIROLOGIA FONDAMENTALE
E CLINICA**

Sede amministrativa: Università di Pisa

Sedi convenzionate: Università di Firenze, Sassari e Siena

**Implicazioni epidemiologiche e
terapeutiche della variabilità genetica di
HIV-1**

Direttore:

Chiar.mo Prof. Mauro Bendinelli

Tesi della Dott.ssa

Francesca Razzolini

INDICE

| | |
|---|----|
| Scopo della tesi | 4 |
| Breve riassunto della tesi | 7 |
| Abstract | 9 |
| Lista delle abbreviazioni | 12 |
| Introduzione | 13 |
| - Organizzazione del genoma e meccanismi di regolazione dell' espressione genica di HIV-1 | 16 |
| - Il ciclo replicativo di HIV-1 | 21 |
| - Caratteristiche cliniche dell'infezione da HIV-1 | 25 |
| - Strategie per il controllo dell'infezione da HIV-1 | 26 |
| - Test di Farmacoresistenza | 39 |
| - Polimorfismo genetico | 46 |
| Materiali e metodi | 58 |
| - Servizio di Monitoraggio HIV dell'Università di Siena | 58 |
| - Trattamento dei campioni | 58 |
| - Studio dei primer di amplificazione e sequenziamento | 59 |
| - Sequenziamento di regioni gag ed env | 60 |
| - Analisi filogenetica per la caratterizzazione dei sottotipi e delle CRFs | 61 |
| Clonaggio | 63 |
| - Ceppi batterici | 63 |
| - Terreni e condizioni di crescita. | 63 |
| - Plasmidi | 64 |
| - Purificazione del prodotto di PCR e ligazione. | 67 |
| Preparazione di cellule elettrocompetenti. | 68 |
| - Elettroporazione | 68 |
| - Trasformazione per heat shock | 69 |
| - PCR di controllo ed estrazione del DNA plasmidico. | 69 |
| - Mutagenesi sito specifica | 69 |
| - Linee cellulari | 70 |

| | |
|---|-----|
| - Trasfezione | 70 |
| Risultati | 72 |
| - Prevalenza e andamento temporale dei sottotipi non-B | 72 |
| - Fattori demografici correlati ai vari sottotipi | 74 |
| - Sequenziamento full-length del campione n. 60.000 | 76 |
| - Studio comparativo delle mutazioni di farmacoresistenza riscontrate nel DNA e RNA di medesimi pazienti. | 83 |
| - Valutazione della resistenza naturale all'enfuvirtide (T20) | 89 |
| - Valutazione dell'insorgenza della resistenza all'enfuvirtide (T20) | 94 |
| - Sviluppo di un saggio ricombinante per la misurazione della capacità replicativa di mutanti farmacoresistenti | 97 |
| Discussione | 102 |
| - Circolazione dei sottotipi non-B e studio di un isolato di interesse dal punto di vista filogenetico | 102 |
| - Valutazione dell'insorgenza della resistenza all'enfuvirtide | 106 |
| - Valutazione comparativa di DNA da linfociti e RNA da plasma per l'individuazione di mutanti farmacoresistenti in soggetti naive | 107 |
| - Allestimento e prospettive future sul saggio di fitness replicativa | 109 |
| Bibliografia | 111 |

Scopo della tesi

Durante i tre anni di frequenza del Corso di Dottorato in 'Virologia fondamentale e clinica' ho avuto modo di proseguire presso il laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Biologia Molecolare dell'Università di Siena, il mio lavoro di collaborazione, iniziato nel 2003 per la preparazione della tesi di Laurea, a un filone di ricerca riguardante l'ottimizzazione di metodiche di biologia molecolare per la diagnosi diretta di infezioni virali, e in particolare per il monitoraggio dell'andamento dell'infezione da HIV-1, e la loro applicazione alla pratica clinica. Nel corso degli anni sono stati allestiti saggi 'in house' per la quantificazione di HIV-1 nei PBMC e per il sequenziamento dei geni *gag*, *pol*, *env* per la stima delle resistenze agli antiretrovirali. Lo sviluppo di questi saggi si è tradotto, nell'offerta, nell'ambito del Servizio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Senese, di un servizio diagnostico, applicabile di routine. Al laboratorio è pervenuto da parte delle cliniche di infettivologia un numero sempre crescente di campioni clinici, attestatosi attualmente nell'ordine dei 1500 per anno, con richieste di determinazione di parametri molecolari, in particolare viremia e farmacoresistenza.

Questo, insieme allo sviluppo, sempre nel laboratorio ospitante, di sistemi informatizzati per la raccolta, l'elaborazione e la valutazione dei numerosi dati ricavati dall'applicazione delle metodiche molecolari alla realtà clinica, ha consentito la realizzazione di numerosi studi, riguardanti la validazione dei saggi in house utilizzati, una valutazione dell'utilità degli stessi nella gestione clinica del paziente, il valore prognostico nel monitoraggio della terapia antiretrovirale dei vari marcatori molecolari analizzati e vari aspetti inerenti la problematica della farmacoresistenza (Zazzi *et al.*, 2000c; Brun-Vezinet *et al.*, 2001; Zazzi *et al.*, 2004c; Zazzi *et al.*, 2004g; Antonelli *et al.*, 2005; Zazzi *et al.*, 2006).

Fra questi vari filoni di studio, il monitoraggio delle farmacoresistenze mediante analisi genotipica è quello che negli ultimi

anni ha visto il maggior sviluppo e la più estesa applicazione alla pratica clinica.

L'introduzione della HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) ha avuto un impatto molto positivo sull'evoluzione clinica dell'infezione nei pazienti trattati; tuttavia non si è ancora raggiunto l'obiettivo dell'eradicazione dell'infezione, e ciò pone una serie di problemi correlati all'impiego a lungo termine delle terapie (aderenza, tossicità, sviluppo di farmacoresistenza). E' ormai appurato che la selezione di mutanti farmacoresistenti costituisce il motivo principale del fallimento terapeutico. In questo contesto resta ancora da chiarire quali possano essere gli interventi per limitare le possibilità di insorgenza di resistenza e gestire la stessa una volta comparsa, la validità clinica dei vari sistemi per il monitoraggio del fenomeno e il significato clinico a medio e lungo termine dei vari quadri di farmacoresistenza.

Data la varietà di trattamenti e la disponibilità di marcatori che possono imporre cambiamenti di terapia in presenza di una mancata risposta o di una ripresa della replica virale, appare oggi molto difficoltoso configurare la valutazione del ruolo della farmacoresistenza all'interno di trials clinici controllati. Al nostro laboratorio sono pervenuti dal 1990 ad oggi oltre 15000 campioni di sangue da soggetti infetti ed è stata allestita una genoteca (DNA da PBMC) e plasmoteca dalla maggioranza di essi. Ogni campione è accompagnato da una scheda informativa che riporta stadio clinico secondo CDC, ultimo rilevamento dei CD4 circolanti in valori assoluti e percentuali, viremia, data del primo accertamento di infezione, storia terapeutica relativamente ai farmaci antiretrovirali. Pur nell'attuale diversificazione delle storie terapeutiche, la casistica consente valutazioni retrospettive specificamente indirizzate al chiarimento del rapporto fra mutazioni negli enzimi bersaglio e risposta ai trattamenti terapeutici.

Gli obiettivi principali del lavoro svolto in questi ultimi tre anni sono stati il monitoraggio dell'andamento delle farmacoresistenze, con la definizione di quali fattori siano associati al rischio di sviluppo di resistenza nella pratica clinica; la circolazione dei sottotipi non-B e la caratterizzazione di alcuni isolati di particolare interesse; la distribuzione delle mutazioni di resistenza nel DNA linfomonocitario vs. l'RNA

plasmatico in soggetti 'naive'; il monitoraggio delle variazioni aminoacidiche nel gene *env* al fine di valutare la suscettibilità ad uno degli ultimi farmaci introdotti nella terapia antiretrovirale, l'inibitore di fusione T20. E' ,inoltre, in corso l'allestimento di un saggio per lo studio della fitness replicativa basato sulla ricombinazione fra un frammento genomico ottenuto dalla popolazione virale del paziente e il 'backbone' di HIV-1 pNL4-3. Il saggio di fitness consisterà in una coltivazione competitiva dell'ibrido così costruito e del tipo selvaggio di riferimento reso riconoscibile mediante inserimento di mutazioni silenziose nella regione *gag*. La dinamica del rapporto quantitativo fra i due virus verrà analizzata a una serie di punti temporali tramite impiego di una coppia di 'probes' in grado di distinguere il virus selvaggio dal ricombinante in esame.

La disponibilità di un saggio pratico e riproducibile per la valutazione della capacità replicativa rappresenta uno strumento di potenziale utilità per la comprensione della complessa relazione fra resistenza e fitness con l'importante ricaduta di indirizzare le scelte terapeutiche verso il mantenimento di una popolazione virale a ridotta patogenicità in quella crescente parte di pazienti nei quali il controllo della replica virale non è più possibile.

Breve riassunto della tesi

L'analisi della casistica accumulata in circa 10 anni di attività del servizio di genotipizzazione di HIV-1 per la stima della farmacoresistenza (dati da 3485 pazienti) ha permesso di tracciare la circolazione dei sottotipi non-B nel bacino di utenza del Servizio di Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Senese.

E' evidente che, come anche per altri paesi europei, la prevalenza dei sottotipi non-B è andata aumentando fino a raggiungere quasi il 29% nell'anno in corso. Nella casistica non-B esaminata è stato riscontrato un numero considerevole di URF (9%), forme non classificabili come nessuno dei sottotipi e CRF finora codificate.

L'analisi filogenetica del gene *pol* ottenuto dal campione n. 60000 nell'ambito della normale attività assistenziale di genotipizzazione ha suggerito che la sequenza in esame, di sottotipo A1, potesse rappresentare un isolato di particolare interesse. L'analisi filogenetica del 'full-length' rivela che rappresenta anello evolutivo fra i ceppi A1 del centro Africa e quelli che hanno ultimamente colonizzato l'ex Unione Sovietica.

E' stata effettuata una valutazione comparativa di sequenza fra la popolazione virale circolante nel plasma e quella archiviata nei PBMC in 212 pazienti 'naive'. Mutazioni di farmacoresistenza nel DNA e/o RNA sono state individuate nella popolazione virale di 35 (16%) pazienti. In 26 (12%) di questi casi sono state individuate mutazioni di resistenza sia nel DNA provirale sia nell'RNA virionico plasmatico; in 3 (1%) e 11 (3%) pazienti sono state invece rilevate mutazioni di resistenza solo nell'RNA e solo nel DNA, rispettivamente.

E' stato allestito il saggio per il rilevamento delle mutazioni di resistenza all'unico inibitore di fusione ad oggi disponibile (T20 o enfuvirtide) che include nel bersaglio anche la parte a monte della regione 36-45 della gp41, comprendendo abbondantemente il dominio V3 della gp120 il quale rappresenta una regione essenziale per lo studio della variabilità virale e costituisce la sequenza codificante per il dominio deputato all'interazione con i corecettori CCR5 e CXCR4. Alla luce di una

possibile espansione dell'uso del T20 nella pratica clinica, è stata valutata la variabilità naturale della gp41 in 228 pazienti T-20 naive nell'intento di individuare se e con quale frequenza possano essere presenti mutazioni coinvolte nella resistenza ad enfuvirtide.

La valutazione della farmacoresistenza contribuisce ad una più efficiente gestione clinica del paziente e a supporto di ciò è in corso l'allestimento di un saggio per la valutazione della fitness replicativa dei mutanti virali resistenti ai PI e/o RTI, basato sulla competizione in coltura fra un ceppo di riferimento (wild - type) e il ricombinante virale in esame.

Per lo sviluppo del vettore retrovirale ricombinante e wild type HIV-1 è stato utilizzato il plasmide pNL4-3 il quale, al fine di ottenere il ceppo mutante, è stato digerito con gli enzimi di restrizione EcoRI e SpeI. Parallelamente anche il plasmide BCSK+ è stato digerito con le stesse endonucleasi EcoRI-SpeI. Abbiamo scelto di utilizzare tale plasmide più piccolo come 'shuttle' per inserire il frammento di nostro interesse su cui poter effettuare più agevolmente le varie tappe di mutagenesi.

I frammenti dei plasmidi sono stati purificati e si è proceduto alla ligation dell'inserito EcoRI-SpeI del pNL4-3 nel plasmide pBCSK+. Sul costrutto ottenuto è stata eseguita mutagenesi sito specifica; l'inserito del pNL4-3 rappresenta il template per una PCR diretta da due primers complementari allo stampo eccetto per i nucleotidi che definiscono la mutazione che inserisce due siti di restrizione unici, PaeI e XbaI

L'introduzione di questi siti di taglio è eseguita in modo da non alterare la sequenza aminoacidica e permette di rimuovere tale pezzo dal plasmide wild-type per poterlo sostituire con un frammento clinico.

In un altro vettore 'shuttle', il pGEMT, sono state introdotte cinque mutazioni silenti per creare un target per il riconoscimento da parte di una sonda Taqman in modo da discriminare il pNL4-3 wild-type da quello con l'inserito clinico. Il saggio per la valutazione della 'fitness' replicativa è basato infatti sulla competizione in coltura fra il virus ricombinante, che esprime i prodotti della regione derivata dal campione clinico, e il virus di riferimento NL4-3. Il rapporto fra le efficienze replicative dei due virus verrà misurato tramite quantificazione relativa dei due tipi di sequenza che contraddistinguono i due ceppi virali in competizione.

Abstract

Background. HIV-1 is among the most variable pathogens known. This has the potential to impact diagnosis, epidemiology and treatment of the infection. Different HIV-1 evolutionary lineages (subtypes and sub-subtypes) have initially spread in distinct geographic areas. Subtype B has been largely prevalent in all the Western countries but other subtypes and circulating recombinant forms (CRFs) have been increasingly detected in latest years. In order to evaluate the prevalence and circulation of the different HIV-1 subtypes CRFs and unique recombinant forms (URFs).

A major issue with HIV variability is the development of drug resistance in atients under antiretroviral treatment and the transmission of drug-resistant strains to newly infected subjects. Since the vast majority of patients failing multiple antiretroviral treatment lines harbor drug-resistant strains, it is potentially relevant to understand whether and how these variants are impaired in replication and possibly less pathogenetic.

Methods. HIV-1 pol sequences obtained through the HIV Monitoring Service of the University of Siena during a 10-year period have been phylogenetically analyzed. In addition, the gag and env regions have been studied in select cases shown to harbor non-B subtypes based on pol.

The presence of reverse transcriptase and protease inhibitor resistance mutations was investigated in parallel plasma and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples obtained from 212 patients naïve to antiretroviral therapy. In addition, the natural variability of the gp41 HR1 and HR2 regions, involved in resistance to the fusion inhibitor enfuvirtide, has been evaluated in 228 patients, mainly infect with non-B subtypes.

A competitive growth assay has been designed for measurement of drug resistance related variations in replicative capacity, based on construction of a recombinant strain and discrimination between the reference wild type virus and the clinical construct through real-time PCR.

Results. The prevalence of non-B subtypes has increased significantly in the last 10 years, reaching 16% in 2006. Subtypes F1, C, CRF01_AE and CRF02_AG were detected as the most prevalent circulating clades but almost all of the subtypes and CRFs were represented. URFs accounted

for as many as 9% of the non-B forms. The use of simple tools such as BLAST and computation of the percentage of homology to reference sequences allowed correct subtyping of all the non-recombinant subtypes and the vast majority of the recombinant forms, although phylogenetic analysis yielded a more detailed characterization of complex variants. Comparison of subtype designation obtained for pol, gag and env regions revealed possible as yet unidentified recombinant forms, particularly between B and F subtypes. An interesting subtype A1 strain was sequenced in its full length and found to be a possible missing link between the former Soviet Union and the original African A1 subgroups. Parallel analysis of plasma RNA and PBMC DNA from drug-naïve patients showed evidence of compartment-specific resistance mutations. Overall, discordances between the RNA and DNA drug resistance mutation patterns were found in as many as 10 of the 24 (41.7%) patients with any evidence of resistant virus. This translated into an inferred decreased susceptibility to an additional 11 drugs (involving 5 patients) in DNA, compared with RNA, as opposed to an additional 2 drugs (involving 1 patient) in RNA, compared with DNA.

Phylogenetic analysis of the env sequences obtained from the 212 enfuvirtide-naïve patients indicated that 102 belonged to subtype B and 95 to non-B subtypes while the remaining 31 were unique recombinant forms. There was considerable variability in the consensus sequence of different clades, particularly in HR-2. The HR-1 amino acid region 36 to 45, containing all of the enfuvirtide resistance mutations so far characterized, was well conserved except for position 42 where serine and asparagine were unevenly distributed in different subtypes. However, some of the mutations outside the amino acid 36–45 region and provisionally suggested to play a role in modulating resistance were detected in a minority of cases.

The development of the fitness competitive assay has been carried on up to the construction of pNL4-3 based vector where the pol region has been deleted and a noncoding region has been mutagenized to be distinguished from the wild type backbone by using two differential Taqman probes. In

order to obtain the patient-derived HIV-1 pol region to insert in pNL4 vector, RNA is extracted from a plasma sample using silica columns. The RNA obtained is the template for a RT-PCR followed by a nested amplification. The amplified region is then co-transfected into 293FT cells with the linearized plasmid vector. The recombinant virus is harvested from the supernatant of the culture and titrated. Mixed infections are then performed in MT2 cells using the recombinant virus and the wild type virus. The DNA extracted from the cellular culture at different time points is used to determine the ratio between the number of DNA copies of the two competing viruses.

Conclusions. The prevalence and circulation of different HIV-1 subtypes is increasing in our formerly B-prevalent area. URFs are being generated at a relevant rate, contributing to further diversification of HIV-1. Continuous surveillance of the impact of this variability is warranted. Routine genotypic resistance assays based on plasma RNA may miss drug resistant variants that are detectable in other compartments. On the other hand, the natural variability of gp41 does not seem to involve positions critical for sensitivity to the first available fusion inhibitor.

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

HIV-1: 'Human Immunodeficiency Virus' tipo 1

HIV-2: 'Human Immunodeficiency Virus' tipo 2

AIDS: 'Acquired Immune Deficiency Syndrome'

RT: trascrittasi inversa

PR: proteasi

IN: integrasi

CRF: 'circulating recombinant forms'

RTI: inibitori della trascrittasi inversa

NRTI: inibitori della trascrittasi inversa analoghi dei nucleosidici

NNRTI: inibitori della trascrittasi inversa non analoghi dei nucleosidici

PI: inibitori di proteasi

HAART: 'highly active antiretroviral therapy'

AZT: zidovudina

TAM: 'thymidine analog mutations'

NAM: 'nucleoside analog mutations'

NEM: 'nucleoside excision mutations'

PBMC: 'peripheral blood mononuclear cells'

GFP: 'green fluorescence protein'

LB: Luria Bertani

Introduzione

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV, "Human Immunodeficiency Virus") è l'agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita, l'AIDS ("Acquired Immuno+deficiency Syndrome") (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984; Blattner *et al.*, 1988). Si tratta di una malattia cronica, a carico del sistema immunitario, che colpisce le cellule immunocompetenti CD4-positive, appartenenti sia alla linea dei linfociti che a quella monocito/macrofagica, causandone un deficit progressivo. Esistono due sottotipi di HIV: HIV di tipo 1 (HIV-1) e HIV di tipo 2 (HIV-2) distinguibili in base a differenze sierologiche e di sequenza nucleotidica (Clavel *et al.*, 1985; Guyader *et al.*, 1987). HIV-1 appartiene alla famiglia *Retroviridae*. Questa famiglia comprende virus caratterizzati dalle seguenti caratteristiche peculiari: 1) contengono un genoma diploide costituito da RNA a singolo filamento, a polarità positiva; 2) il loro ciclo replicativo comporta la conversione dell'RNA genomico in un doppio filamento di DNA lineare che è successivamente integrato (il cosiddetto provirus) nel DNA cromosomico della cellula ospite. Entrambi questi processi sono mediati da enzimi virali, la trascrittasi inversa e l'integrasi, rispettivamente (Varmus *et al.*, 1989).

Nella famiglia *Retroviridae* si possono distinguere tre gruppi: oncovirus, lentivirus e spumavirus. HIV-1 appartiene al gruppo dei lentivirus il quale comprende virus che instaurano un'infezione persistente e determinano malattie cronico-degenerative a lenta progressione in vari mammiferi, spesso associate ad immunosoppressione e disturbi a livello del sistema nervoso centrale (Letvin, 1990). La particella virale di HIV-1 ha una forma sferica, con un diametro di circa 110 nm ed è formata da un involucro esterno (envelope o pericapside) e da un capsidone costituito da una porzione esterna (matrice) e da una porzione centrale (nucleocapsidone o core) (Fig. 1). Il pericapsidone è costituito da una membrana a doppio strato lipidico, derivata dalla membrana plasmatica della cellula ospite, dalla quale sporgono le glicoproteine virali. Ciascuna glicoproteina è un eterodimero costituito da una subunità transmembrana del peso

molecolare di 41 kD (gp41) e da una subunità esterna, altamente glicosilata, di 120 kD (gp120), legate fra loro mediante legami non covalenti. Quest'ultima subunità riveste un ruolo fondamentale nell'ingresso del virus nella cellula ospite, interagendo specificamente con la molecola CD4, il recettore di HIV-1 (Bour *et al.*, 1995). Oltre alla glicoproteina virale, l'involucro esterno contiene altre proteine che probabilmente vengono acquisite dalla membrana della cellula ospite durante il processo di gemmazione del virus (Arthur *et al.*, 1992).

La matrice è costituita da una proteina di 17 kD, la p17 (MA), che si estende nello spazio compreso tra la superficie interna del pericapside ed il core e risulta di vitale importanza per l'integrità e l'infettività del virus (Gottlinger *et al.*, 1989; Zhou *et al.*, 1994). Durante l'assemblaggio della particella virale, la p17 ha un ruolo fondamentale sia nel veicolare i precursori strutturali e le glicoproteine alla membrana plasmatica della cellula ospite sia nella loro incorporazione nel virione nascente.

Il nucleocapside costituisce il core vero e proprio del virione maturo; esso assume una forma conica "a cartuccia" e la sua principale componente strutturale è la proteina p24, di 24 kD. All'interno del core, il genoma virale a RNA è unito a due proteine basiche con un peso molecolare di 7 kD e di 9 kD, rispettivamente p7 e p9, a formare il cosiddetto complesso nucleoproteico. Del nucleocapside fanno parte anche gli enzimi richiesti per la maturazione dei virioni e per gli stadi iniziali dell'infezione virale:

- la proteasi (PR) interviene nella modificazione delle poliproteine virali durante la fase di maturazione del virione e nel processamento degli enzimi replicativi. L'enzima appartiene alla famiglia delle aspartil proteasi ed è funzionale come omodimero, costituito da due monomeri di 99 amminoacidi ciascuno (Loeb *et al.*, 1989). La proteasi riconosce e taglia 9 sequenze amminoacidiche specifiche con affinità diversa, causando così una serie ordinata di riarrangiamenti strutturali che portano alla maturazione della particella virale (Erickson *et al.*, 1999; Miller, 2001) e alla produzione degli enzimi replicativi;
- la trascrittasi inversa (RT) è responsabile della sintesi del DNA lineare a doppio filamento a partire dall'RNA genomico (Le Grice

1993). La RT è un eterodimero composto da una subunità di 66 kD (p66) e da una subunità di 51 kD (p51) derivanti entrambe dallo stesso precursore proteico (Pr160): p51 si forma quando dall'estremità C-terminale di p66 viene rimossa per taglio proteolitico una porzione di 15 kD corrispondente al dominio della RNasi H (Huang *et al.*, 1998; Kohlstaedt *et al.*, 1992). La RT è priva di attività esonucleasica 3'→5' (Mansky LM, 1998), in mancanza della quale si osserva quindi un alto tasso di mutazione (3×10^{-5} mutazioni per ciclo) che, associato a un elevato ritmo di replicazione (10^7 cicli replicativi al giorno pari a $>10^9$ particelle virali prodotte) (Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995) e ad una frequente ricombinazione fra i genomi virali copresenti nella stessa cellula o nello stesso virione, causa un'alta eterogeneità di sequenza nella popolazione virale presente in un paziente: si parla infatti di "quasispecie virale" (Coffin JM, 1995; Mansky LM *et al.*, 1995; Domingo *et al.*, 1999);

- la RNasi H, un dominio proteico della subunità p66 della RT, con funzione di endonucleasi, interviene in diverse fasi della trascrizione inversa producendo inneschi ("primer") e stampi ("template") per la RT (Davies *et al.*, 1991; Hostomsky *et al.*, 1991);
- l'integrasi (IN), proteina da 32 kD, richiesta per l'integrazione del DNA provirale nel genoma della cellula ospite (Masuda *et al.*, 1995; Brown, 1997).

All'interno del core proteico è contenuto il genoma virale, costituito da due molecole di RNA a singolo filamento a polarità positiva, lunghe circa 9300 nucleotidi ciascuna, legate tra loro in configurazione antiparallela all'estremità 5' (Coffin *et al.*, 1996).

Entrambi i filamenti portano alle rispettive estremità una sequenza unica (U5 in 5' e U3 in 3') fiancheggiata esternamente da una sequenza ripetuta R. E' da queste regioni del genoma che si formano, durante il processo di retrotrascrizione, le due LTR ("long terminal repeats") organizzate nella struttura U3-R-U5, presenti alle estremità del genoma provirale.

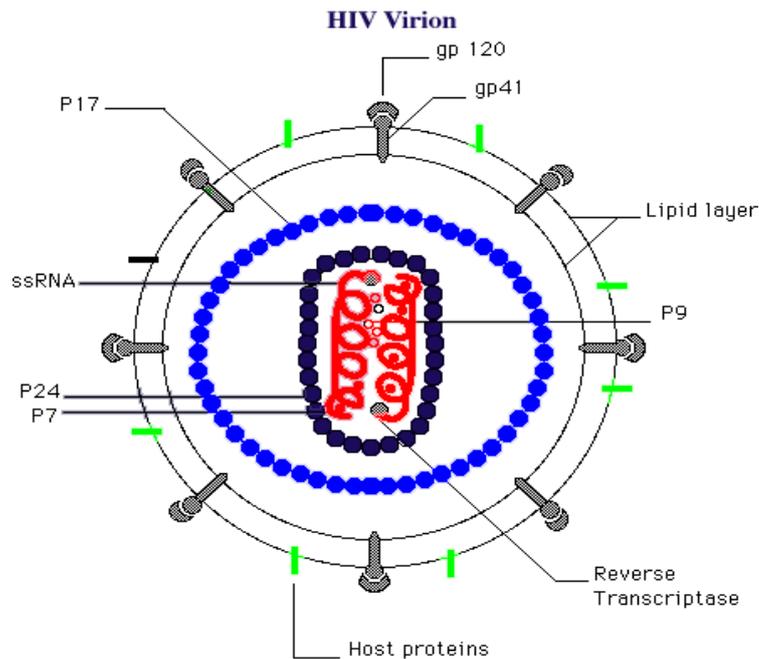


Fig. 1 Rappresentazione schematica di un virione di HIV-1.

Organizzazione del genoma e meccanismi di regolazione dell'espressione genica di HIV-1

Come per la maggior parte dei retrovirus, il genoma di HIV-1 è costituito da tre geni definiti rispettivamente, *gag*, *pol*, *env*. Il gene *gag* codifica le proteine strutturali che intervengono nella formazione del nucleocapside virale, nel suo ancoraggio alla membrana e nell'incorporazione dell' RNA genomico nello stesso nucleocapside; *pol* codifica le proteine enzimatiche (proteasi, trascrittasi inversa e integrasi) ed *env* codifica le glicoproteine dell' involucro esterno (Varmus *et al.*, 1989). Nella forma integrata del DNA provirale, i tre geni sono orientati sempre nella stessa direzione (5'-*gag-pol-env*-3') e sono fiancheggiati dalle caratteristiche sequenze lunghe ripetute ("Long Terminal Repeats", o LTR) generate durante il processo di retrotrascrizione (Fig. 2). Inoltre i lentivirus si distinguono dagli altri retrovirus per la complessità del loro genoma; in particolare il genoma di HIV-1 comprende, oltre ai geni *gag*, *pol*, *env*, almeno sei geni accessori: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (in HIV-1) oppure *vpx* (in HIV-2).

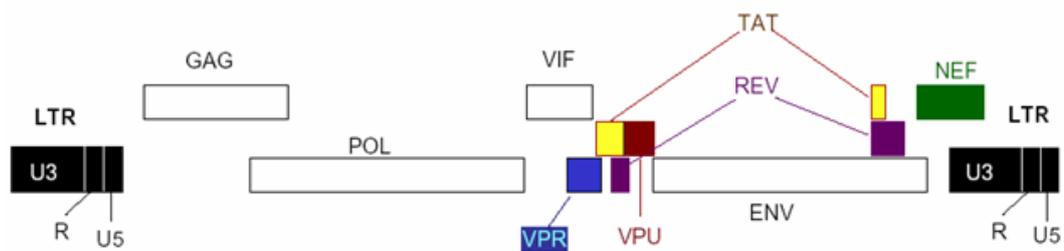


Fig. 2 Struttura del genoma di HIV-1. Sono indicate le proteine virali note. Si possono individuare la 5'LTR e la 3'LTR, contenenti le sequenze regolatrici riconosciute da diversi fattori di trascrizione cellulari.

Le LTR contengono le sequenze necessarie per la trascrizione del provirus, per la replicazione virale, per l'integrazione e per l'espressione genica. La trascrizione dell'RNA virale dal DNA provirale inizia a livello della 5' LTR, nella regione compresa tra la sequenza R e U5, ed è mediata dalla RNA polimerasi II cellulare (Varmus *et al.*, 1989). L'estremità 5' del trascritto virale viene modificata mediante l'aggiunta di una 7-metil GTP (CAP), ad opera di enzimi cellulari. L'estremità 3' viene modificata per l'aggiunta di una sequenza di adenine (poly-A) (Cherrington *et al.*, 1992).

La trascrizione del genoma virale dà origine principalmente a tre classi di mRNA: 1) di lunghezza completa (9 kb); 2) di dimensioni intermedie (4 e 5 kb); 3) di piccole dimensioni (2 kb). I trascritti di dimensioni intermedie e piccole originano dall'RNA genomico in seguito, rispettivamente, a singoli o molteplici eventi di taglio post-trascrizionale ("splicing"). I trascritti di piccole dimensioni codificano le proteine regolatrici Tat, Rev e Nef e sono prodotti in elevata quantità durante le prime fasi del ciclo replicativo di HIV-1 (Pavlakakis *et al.*, 1992). I trascritti di lunghezza completa ed intermedia, invece, codificano le proteine Gag, Pol, Env, Vif, Vpr e Vpu (Pavlakakis *et al.*, 1992) e sono prodotti nelle fasi tardive della replicazione virale. Il primo evento trascrizionale che coinvolge il provirus comporta la formazione di corti trascritti incompleti, corrispondenti alla regione TAR ("*trans*-activation response sequence"), localizzata in una regione della 5' LTR (Rosen *et al.*, 1985; Rosen *et al.*, 1988; Cullen, 1993), e di una piccola frazione di trascritti che corrisponde al genoma virale completo (9

kb). L'mRNA di 9 kb viene rapidamente modificato, tramite numerosi eventi di "splicing", dando origine a corti mRNA codificanti le proteine regolatrici Tat, Rev e Nef.

Tat e Rev sono essenziali per la replicazione del virus. Tat, proteina di 101 amminoacidi, attiva la trascrizione legandosi alla sequenza TAR e interagendo con fattori cellulari. Tat incrementa l'efficienza dei processi di iniziazione e di elongazione della trascrizione aumentando la processività dell' RNA polimerasi II. Questo processo favorisce la produzione di trascritti lunghi di 9 Kb (Zhou *et al.*, 1995).

Il passaggio dalla fase precoce a quella tardiva è regolato dalla proteina Rev di 19 kD. In sua assenza, la maggior parte degli RNA subisce molteplici eventi di "splicing" che generano i corti trascritti di 2 kb. Quando viene prodotta, Rev funziona come transattivatore post-trascrizionale e legandosi con elevata affinità alla sequenza di RNA genomico RRE ("Rev responsive element"), localizzata nel gene *env*, promuove il trasporto dal nucleo al citoplasma dell'mRNA genomico e di quello del gene *env*, sottoposto ad un singolo evento di "splicing" (Rosen *et al.*, 1988; Malim *et al.*, 1989; Mikaelian *et al.*, 1996; Pollard *et al.*, 1998). In questo modo Rev favorisce l'espressione dei geni strutturali, promuovendo il trasporto dal nucleo al citoplasma degli mRNA relativi che vengono così sottratti ai processi di "splicing", mentre quella dei geni regolatori viene inibita (Cullen, 1998; Pongoski *et al.*, 2002). Gli mRNA Rev-dipendenti codificano anche la proteina Nef, che si origina dopo molti eventi di "splicing". Nef è una fosfoproteina di 27 kD associata alla membrana tramite un acido miristico presente all' estremità N-terminale; è coinvolta nella degradazione del recettore CD4 promuovendone l'endocitosi in vescicole rivestite da clatrina (Aiken *et al.*, 1994), al fine di ridurre la formazione del complesso gp120-CD4 intracellulare e aumentare così la quantità di glicoproteina virale veicolata in membrana. Inoltre, Nef induce la degradazione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe prima (MHC I), limitando la capacità dei linfociti T citotossici di individuare ed eliminare le cellule infettate (Collins *et al.*, 1998).

Per quanto riguarda l'espressione dei geni strutturali di HIV-1, le proteine del *gag* si formano da un unico precursore poliproteico (Pr55)

(Swanstrom *et al.*, 1997; Freed *et al.*, 1998). Durante la maturazione del virus, questo precursore viene processato a opera della proteasi virale, dando origine a diverse proteine di dimensioni più piccole, che sono rispettivamente dall'estremità N-terminale: la p17, la p24, la p7 e la p6. Il precursore viene modificato co-traduzionalmente all'estremità N-terminale, mediante l'aggiunta di una molecola di acido miristico e questa modificazione è essenziale per l'ancoraggio del precursore Gag alla membrana cellulare al momento dell'assemblaggio del virione. Inoltre, la poliproteina contiene segnali di trasporto alla membrana cellulare, promuove l'assemblaggio dei precursori proteici virali in membrana, si associa con le glicoproteine virali, media l'incorporazione dell'RNA genomico nel virione e infine stimola la gemmazione della particella virale dalla cellula ospite.

I prodotti del gene *pol* derivano da un precursore poliproteico di fusione, Gag-Pol (Pr160), originato per un evento di scorrimento della fase di lettura del ribosoma ("frameshift") a livello dell'estremità carbossiterminale del gene *gag* (Jacks *et al.*, 1988). Questo evento è piuttosto raro, per cui il rapporto tra le proteine strutturali codificate dal gene *gag* singolarmente rispetto agli enzimi replicativi codificati dal gene *pol* è di circa 20:1 (Hunter, 1994). Successivamente il precursore Gag-Pol viene clivato e vengono così a costituirsi, oltre alle proteine strutturali del capsido, i tre enzimi replicativi: la proteasi, la trascrittasi inversa e l'integrasi.

Il prodotto del gene *env* è inizialmente costituito da un precursore poliproteico (gp160), che a livello del reticolo endoplasmatico viene altamente glicosilato e processato da una proteasi cellulare (furina) per dare origine alla glicoproteina esterna (gp120) e alla proteina transmembrana (gp41) (Freed *et al.*, 1995). Infine, tramite la via secretoria, la gp120 e la gp41 vengono trasportate alla membrana cellulare, dove interagiscono mediante legami non covalenti organizzandosi in trimeri.

I rimanenti geni accessori includono *vpr*, *vpu*, *vif*; sono considerati geni "ausiliari" poiché, *in vitro*, non sono essenziali per il ciclo replicativo virale, ma *in vivo* contribuiscono all'infettività del virus e alla progressione della malattia. Vpr, proteina di 14 kD prodotta da un mRNA sottoposto ad un

unico evento di “splicing”, viene incorporata nel virione tramite l’interazione con la porzione carbossiterminale del precursore Gag. Vpr è responsabile dell’arresto delle cellule infettate in fase G₂ (He *et al.*, 1995; Chowdhury *et al.*, 2003), stadio del ciclo cellulare in cui l’attività delle LTR è più intensa, comportando una maggiore produzione di particelle virali. Inoltre, Vpr è coinvolta nella migrazione del DNA virale nel nucleo (Agostini *et al.*, 2002; Sherman *et al.*, 2002) e nell’attivazione di promotori virali e cellulari (Cohen *et al.*, 1990).

Il prodotto del gene *vpu*, Vpu, è una proteina di 81 amminoacidi che si genera dallo stesso mRNA che dà origine alla glicoproteina dell’envelope (Schwartz *et al.*, 1990). Vpu facilita il rilascio delle particelle virali dalla superficie cellulare (Klimkait *et al.*, 1990; Paul *et al.*, 1998; Deora *et al.*, 2001) e come Nef, promuove la degradazione del recettore CD4 tramite la via “ubiquitina-proteosoma” (Margottin *et al.*, 1998).

La proteina Vif si forma da un trascritto che subisce un unico evento di “splicing” (Garrett *et al.*, 1991) ed è altamente conservata fra i lentivirus. Viene incorporata nella particella virale tramite l’interazione con l’RNA genomico (Khan *et al.*, 2001) ed è considerata un importante meccanismo di neutralizzazione nei confronti del sistema di difesa cellulare basato su mutagenesi letale indotta dal sistema delle citidina deaminasi (Harris *et al.*, 2004). Particelle virali Vif-difettive sono scarsamente infettive (Strebel *et al.*, 1989, Fujita *et al.*, 2003). Il fenotipo Vif-negativo si manifesta nelle fasi precoci dell’ infezione come fallimento del processo di retrotrascrizione.

Il ciclo replicativo di HIV-1

Il ciclo replicativo di HIV-1 può essere schematicamente diviso in due tappe:

- 1) la “lisogenizzazione” (o infezione latente), con la formazione del DNA virale e la sua integrazione e
- 2) l’infezione produttiva.

L’infezione inizia quando la particella virale interagisce specificamente, mediante la glicoproteina di superficie gp120, con il recettore per HIV-1: la molecola CD4 presente sulla superficie dei linfociti T e delle cellule della linea monocito-macrofagica. Questa interazione ad alta affinità è responsabile, *in vitro*, della formazione di sincizi fra le cellule esprimenti il recettore CD4 e quelle esprimenti in superficie la glicoproteina virale gp120. Si può quindi distinguere un fenotipo formante sincizi, SI (“syncytium inducing”) e un fenotipo non formante sincizi, NSI (“non-syncytium inducing”).

Nella penetrazione intracellulare di HIV-1 sono coinvolti anche altri fattori cellulari, i corecettori; infatti il recettore CD4 non è sufficiente a spiegare il tropismo di HIV-1, *in vitro*, nei confronti di diversi sottogruppi di cellule CD4-positive. È stato dimostrato che alcuni isolati virali sono caratterizzati da un tropismo specifico per le cellule della linea monocito-macrofagica (*isolati primari macrofago-tropici*, M-tropici); hanno un ridotto tasso di replicazione e non sono in grado di indurre la formazione di sincizi *in vitro* (fenotipo NSI). Altri isolati virali sono in grado di infettare efficientemente i linfociti T CD4-positivi e mostrano una bassa infettività nei confronti di cellule della linea monocito-macrofagica; in questo caso si parla di “*isolati primari T-tropici*”. Questi virus si replicano rapidamente e sono caratterizzati dalla capacità di indurre sincizi *in vitro* (fenotipo SI). Lo studio di questi fenomeni ha portato all’identificazione dei corecettori responsabili del diverso tropismo di HIV-1. Sono molecole appartenenti alla famiglia dei recettori per le chemochine (Choe *et al.*, 1996; Doms *et al.*, 1997; Choe, 1998; Berger *et al.*, 1999). Due corecettori sembrano essere particolarmente importanti *in vivo*: il recettore per le α -chemochine

denominato CXCR4 (originariamente definito fusina) usato dai ceppi T-tropici e quello per le β -chemochine, CCR5, usato dai ceppi M-tropici.

Durante la penetrazione intracellulare, lo stadio essenziale è il legame della glicoproteina virale al CD4; questa prima interazione promuove importanti riarrangiamenti conformazionali nell'envelope, che permettono l'esposizione di siti di legame critici per i corecettori. Il legame dei corecettori stessi a questi siti induce una nuova modificazione conformazionale, che promuove l'inserimento di un dominio di gp41, chiamato peptide di fusione, nella membrana della cellula bersaglio, e quindi permette di iniziare il processo di fusione. La fusione fra le membrane virali e cellulari deriva da una serie complessa di eventi e di cambi conformazionali che coinvolgono la gp41, la gp120, il CD4 e i corecettori (Fig. 4):

- gp120 si lega al CD4 e cambia conformazione esponendo il sito di legame per il corecettore (corrispondente in gran parte al dominio V3);
- il legame con il corecettore favorisce l'inserimento del peptide di fusione, situato all'N-terminale della gp41, nella membrana plasmatica;
- la gp41 si trova quindi ad essere un componente sia della membrana virale che cellulare giustappponendo le due membrane;
- le due regioni 'heptad repeat' HR1 e HR2 della gp41, situate rispettivamente al dominio N-terminale e vicino al dominio transmembrana di gp41, interagiscono;
- le eliche HR2 legano le HR1 in un orientamento antiparallelo creando un fascio di sei eliche;
- il cambio di energia associato con questa transizione strutturale rende possibile la fusione fra i lipidi e quindi delle due membrane (Miller *et al.*, 2004, Doms RW, 2002).

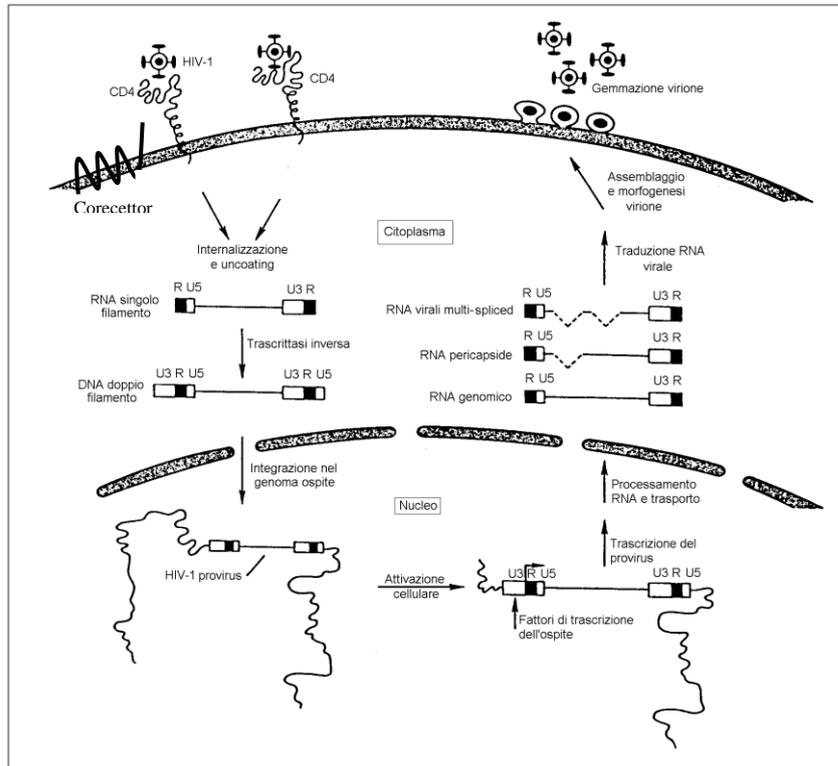


Fig. 3 Rappresentazione schematica del ciclo replicativo di HIV-1.

Dopo la penetrazione del virus all'interno della cellula, viene rimosso il capsido e l'RNA genomico è convertito in DNA a doppio filamento ad opera della RT. Durante la sintesi del DNA provirale, l'RNA genomico è degradato dalla RNAsi H virale e gli acidi nucleici rimangono associati in un complesso nucleoproteico, costituito da proteine virali che portano un segnale di localizzazione nucleare (p17, Vpr, IN). Una volta migrata nel nucleo, la molecola di DNA viene integrata nel DNA cromosomico ad opera dell'IN (Brown, 1990; Brown, 1997). Avvenuta l'integrazione, il DNA provirale resta permanentemente associato a quello della cellula ospite: si può instaurare un'infezione latente, se il genoma virale rimane completamente silente, oppure un'infezione produttiva, quando si osserva l'espressione attiva dei geni e la trascrizione del DNA provirale da parte della polimerasi cellulare. Le proteine virali ed il genoma di HIV-1 vengono poi assemblati in nuove particelle virali che gemmano dalla cellula ospite infettata. Il complesso costituito dalla proteina del capsido, dagli enzimi replicativi e dall'RNA genomico si assembla a livello della superficie

interna della membrana plasmatica, alla quale il complesso di assemblaggio è ancorato, grazie alla miristilazione del precursore capsidico (Hunter, 1994; Lee *et al.*, 1994). Viene così a formarsi una struttura ricurva, che sporge dalla membrana in un punto dove si è concentrata anche la proteina dell'envelope; in seguito, il nucleocapside assume una forma sferica ed il virione è rilasciato per gemmazione dalla membrana cellulare. La digestione proteolitica del precursore capsidico e di quello degli enzimi replicativi, ad opera della PR virale, rappresenta lo stadio finale della formazione dei virioni maturi ed avviene solo in seguito al rilascio della particella dalla cellula. Questa modificazione proteolitica risulta in un riorientamento della proteina capsidica: la porzione aminotermine (MA) rimane in contatto con la superficie interna del pericapside, mentre l'estremità carbossiterminale (CA) si assembla in forma di cono. Se questa proteolisi si verifica prima della gemmazione, la struttura capsidica collassa, ed il distacco dalla cellula non può avvenire.

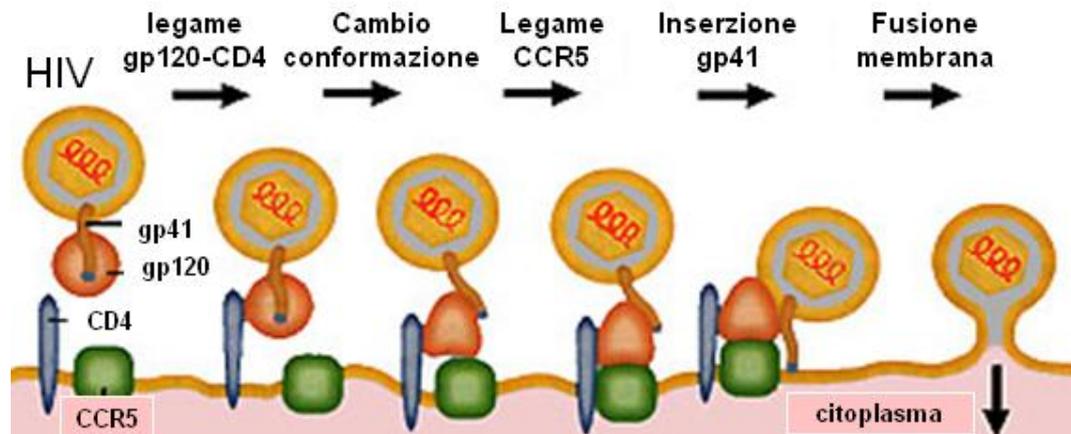


Fig.4 Meccanismo di fusione delle due membrane. Dopo il legame della gp120 con il CD4 si verifica un cambio di conformazione della gp120 che lascia scoperti i siti di legame per il corecettore. Questa modificazione nella struttura consente l'inserzione del peptide di fusione nella membrana plasmatica.

Caratteristiche cliniche dell'infezione da HIV-1

Il decorso dell'infezione da HIV è caratterizzato da diverse fasi cliniche (Fig. 5), la cui evoluzione è molto variabile potendo essere influenzata da vari fattori tra cui l'impiego di una adeguata terapia antiretrovirale.

La fase iniziale dell'infezione, definita "acuta" o "primaria", rappresenta il periodo immediatamente successivo al contagio. Nelle prime settimane gli anticorpi specifici anti-HIV non sono ancora presenti, per cui il test per la diagnosi di sieropositività risulta negativo. Il periodo compreso tra il contagio e la positivizzazione del test anticorpale (sieroconversione) è definito "periodo finestra" e può variare da 2 a >10 settimane. Questa fase può decorrere in modo del tutto asintomatico oppure essere caratterizzata da sintomi clinici aspecifici simili a quelli dell'influenza o della mononucleosi, come febbre, mal di gola, stanchezza, ingrossamento delle ghiandole linfatiche, eruzioni cutanee. In questo periodo si osserva un declino significativo del livello di linfociti T CD4-positivi nel sangue periferico (Gaines *et al.*, 1990) ed un rapido aumento della viremia (copie di RNA virale/ml) nel plasma (Daar *et al.*, 1991; Tindall *et al.*, 1991)

La fase successiva è di solito clinicamente latente ma è caratterizzata da una continua replicazione del virus a livello dei tessuti linfoidi causando una lenta, ma graduale perdita di linfociti T CD4-positivi.

La fase definita "linfadenopatia generalizzata persistente" (PGL), spesso, non è differenziabile da un punto di vista clinico dalla precedente, se non per l'ingrossamento dei linfonodi, che presentano un'alterazione della propria struttura istologica.

Con il progredire del danno al sistema immunitario, evidenziato dalla marcata riduzione dei linfociti T CD4-positivi nel sangue (da normali valori di 1000 cellule/mm³ si passa a <200 cellule/mm³), l'organismo è esposto ad infezioni opportunistiche, all'insorgere di neoplasie e disturbi a carico del SNC. La comparsa di queste patologie segna l'inizio della malattia conclamata, nota con l'acronimo AIDS.

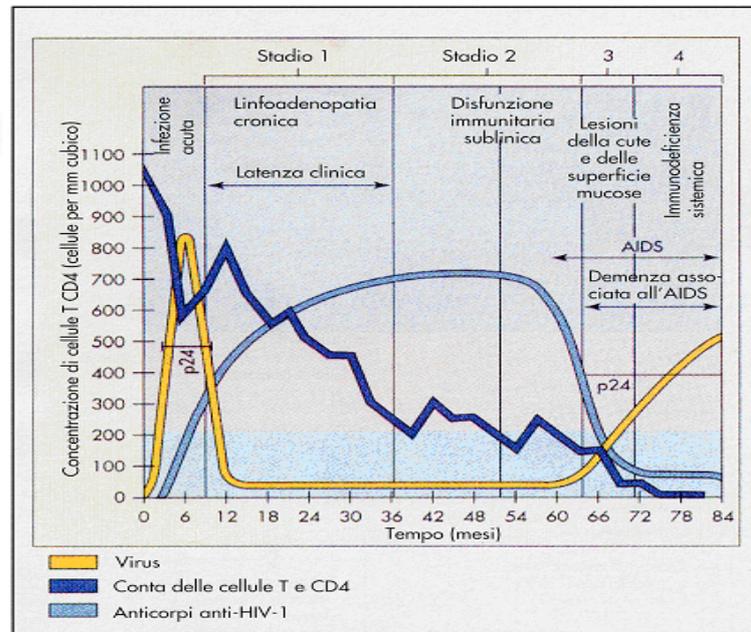


Fig.5 Fasi cliniche dell'infezione da HIV-1.

Strategie per il controllo dell'infezione da HIV-1

Attualmente la chemioterapia dell'infezione da HIV-1 (HAART) è basata su associazioni di farmaci che inibiscono il funzionamento della RT e della PR di HIV-1, responsabili rispettivamente della retrotrascrizione del genoma virale e della maturazione del virione.

A questi si è successivamente aggiunta una terza classe di farmaci antiretrovirali, gli inibitori di fusione, il cui capostipite è l'enfuvirtide (Fuzeon o T20), ad oggi l'unico inibitore di fusione approvato dalla FDA per il trattamento di HIV (Tab. 1). Farmaci di altre classi, come gli inibitori di integrasi (Pommier *et al.*, 2005) e gli antagonisti dei corecettori (Leonard *et al.*, 2006), sono in fase di sperimentazione.

Tabella 1. Farmaci antiretrovirali in uso clinico.

A. Inibitori di trascrittasi inversa, analoghi dei nucleosidi/nucleotidi (NRTI)

| Sigla | Nome generico | Nome commerciale | Azienda produttrice |
|-------------------------|---------------|------------------|-----------------------|
| AZT (azidotimidina) | Zidovudina | Retrovir | GlaxoSmithKline |
| ddl (dideossinosina) | Didanosina | Videx | Bristol-Meyers-Squibb |
| ddC (dideossicitidina) | Zalcitabina | HIVID | Hoffman-La Roche |
| d4T(dideidrotimidina) | Stavudina | Zerit | Bristol-Meyers-Squibb |
| 3TC (deossitiacitidina) | Lamivudina | Epivir | GlaxoSmithKline |
| ABC | Abacavir | Ziagen | GlaxoSmithKline |
| TDF | Tenofovir | Viread | Gilead |
| FTC | Emtricitabina | Emtriva | Gilead |

B. Inibitori di RT, non analoghi dei nucleosidi (NNRTI)

| Sigla | Nome generico | Nome commerciale | Azienda produttrice |
|-------|---------------|------------------|-----------------------|
| NVP | Nevirapina | Viramune | Boehringer Ingelheim |
| DLV | Delavirdina | Rescriptor | Pharmacia-Upjohn |
| EFV | Efavirenz | Sustiva | Bristol-Meyers-Squibb |

C. Inibitori di PR (PI)

| Sigla | Nome generico | Nome commerciale | Azienda produttrice |
|-------|---------------------|------------------|-----------------------|
| SQV | Saquinavir | <u>Fortovase</u> | Hoffman-La Roche |
| RTV | Ritonavir | Norvir | Abbott |
| IDV | Indinavir | Crixivan | Merck |
| NFV | Nelfinavir | Viracept | Agouron Pharm. |
| APV | Amprenavir | Agenerase | GlaxoSmithKline |
| LPV/r | Lopinavir/ritonavir | Kaletra | Abbott |
| ATV | Atazanavir | Reyataz | Bristol-Meyers-Squibb |
| TPV | Tipranavir | Aptivus | Boehringer Ingelheim |
| DRV | Darunavir | Prezista | Janssen-Tibotec |

D. Inibitori di fusione

| Sigla | Nome generico | Nome commerciale | Azienda produttrice |
|-------|---------------|------------------|---------------------|
| T20 | Enfuvirtide | Fuzeon | Hoffman-La Roche |

Gli NRTI competono con i dNTPs naturali e, una volta incorporati nel DNA virale nascente al posto di questi ultimi, causano la terminazione dell'allungamento della catena bloccando quindi la sintesi del DNA. Tutti gli NRTI sono di natura nucleosidica ad eccezione del TDF che ha invece struttura nucleotidica. Gli NNRTI si legano invece direttamente ad una specifica regione dell'enzima in prossimità del sito catalitico agendo non competitivamente per bloccare la retrotrascrizione.

I PI, gli agenti antiretrovirali di maggiore potenza, si legano al sito attivo della PR, impedendo all'enzima la normale attività di processazione delle poliproteine indispensabile per la formazione di nuove particelle virali infettanti.

Il T20 blocca il processo di fusione. E' un peptide sintetico di 36 aa (Fig. 6) che mima la regione HR2 di gp41, legandosi a quella HR1 e quindi impedendo la creazione del 'bundle' a sei eliche indispensabile per la fusione tra le due membrane (quella cellulare e quella virale) (Fig. 7).

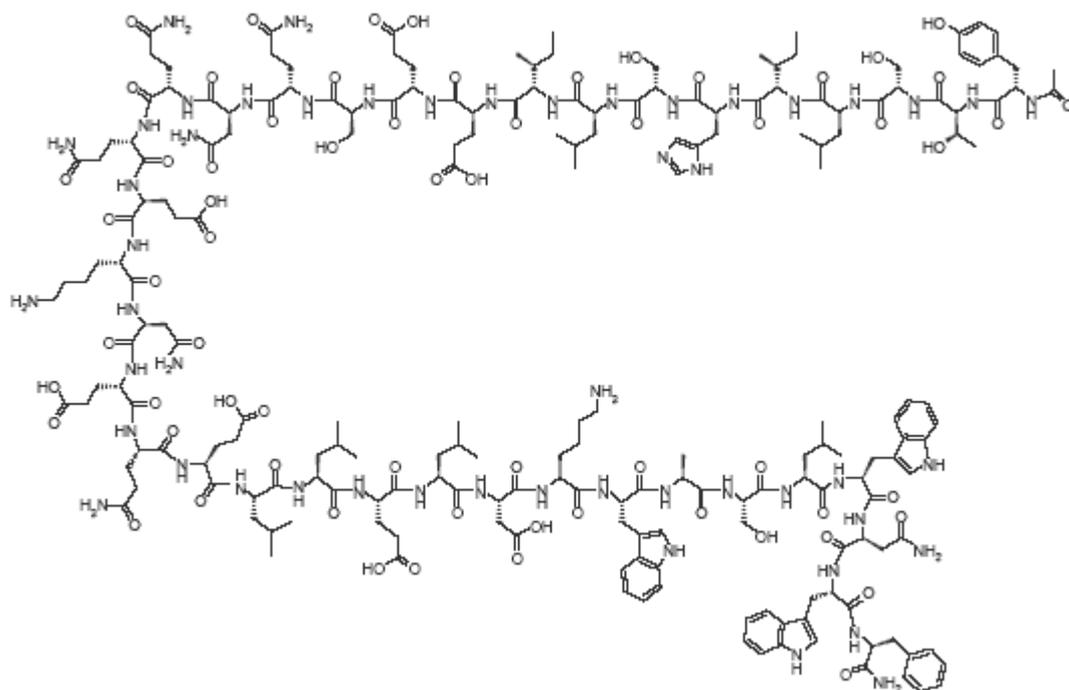
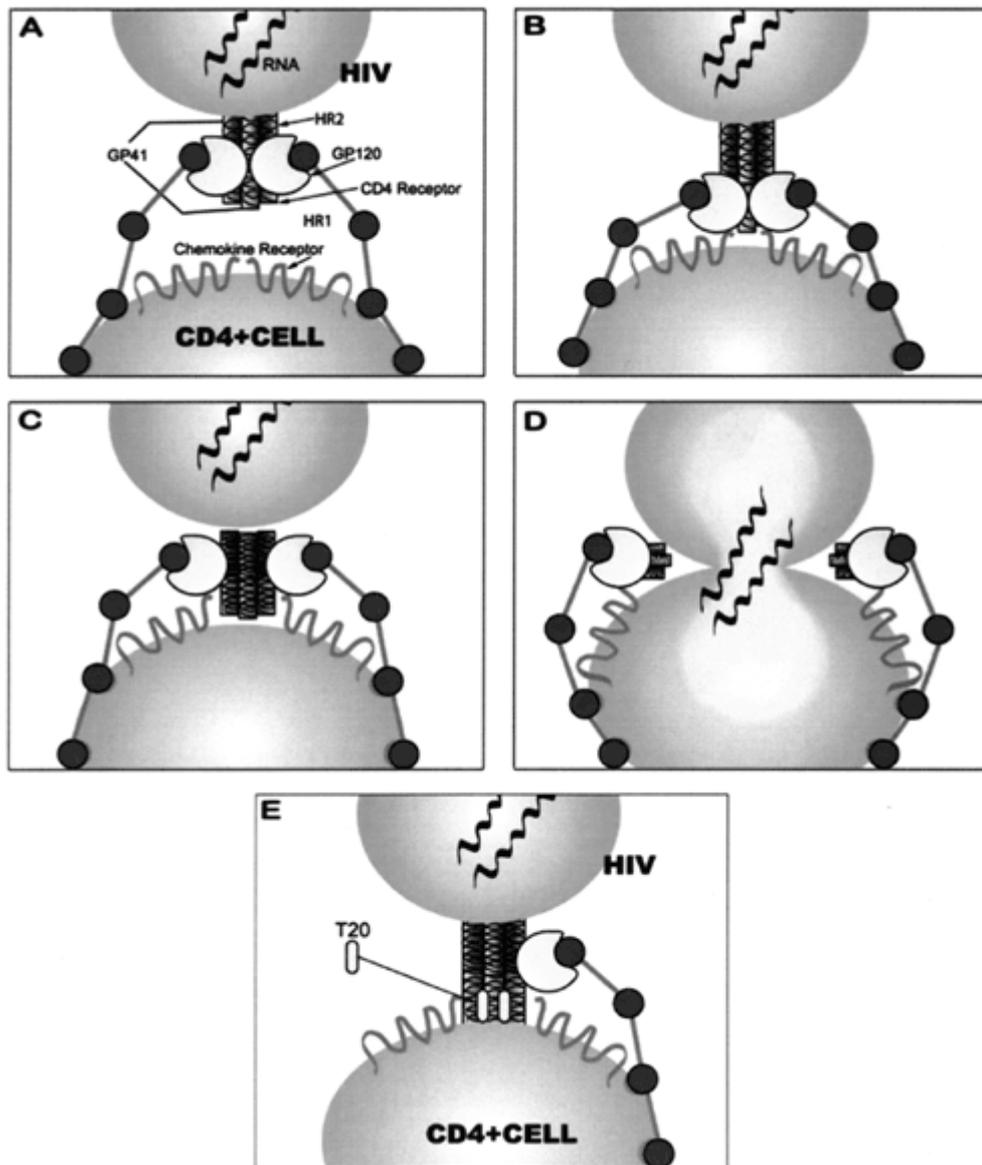


Fig. 6 Struttura dell' enfuvirtide (CH₃CO-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys- Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser- Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂).



Source: Pharmacotherapy © 2004 Pharmacotherapy Publications

Fig.7 Meccanismo di funzionamento dell'enfuvirtide. (A) La fusione dell'HIV con la cellula bersaglio inizia con l'adesione della gp120 al dominio N-terminale del CD4. (B) Successivamente all'adesione, la gp120 cambia di conformazione consentendo lo smascheramento del sito di legame per i corecettori cellulari (CCR5 or CXCR4). (C) Dopo il legame del virus al CD4 ed al corecettore si verifica un successivo cambio di conformazione che espone la regione N-terminale idrofobica della gp41 alla membrana cellulare. Questo consente alle due regioni HR1 e HR2 della gp41 di interagire rendendo possibile la formazione dell' 'hairpin' anche chiamata 'coiled-coil bundle'. (D) La struttura 'hairpin' avvicina le due membrane mediando la fusione del virus e della cellula. (E) In presenza di enfuvirtide (T20), le due regioni 'heptad' non possono interagire tra loro in quanto il farmaco si lega competitivamente all'HR1 bloccando la formazione della struttura ad uncino necessaria per l'inizio della fusione.

Dal punto di vista cellulare gli inibitori di fusione presentano alcuni potenziali vantaggi rispetto alle classi precedentemente sviluppate: agiscono extracelluralmente e quindi non sono soggetti al trasporto intracellulare che potrebbe abbassarne la resa, non interagiscono con il sistema dei citocromi come avviene invece per i PI, non hanno necessità di attivazione intracellulare come per gli NRTI, hanno una bassa tossicità perché scarsamente processati intracellularmente (Greenberg *et al.*, 2004).

Altri inibitori di entrata in fase di sperimentazione clinica (Pierson *et al.*, 2003) sono suddivisi in base al loro meccanismo d'azione in:

- inibitori dell'interazione fra il recettore CD4 e la glicoproteina gp120 legando quest'ultima con elevata affinità. Un esempio è la molecola PRO-542, una proteina ricombinante simile alle immunoglobuline umane;
- inibitori che funzionano da ligandi per i corecettori CCR5 e CXCR4 impedendo l'interazione con la gp120; esempi sono le molecole TAK-779, SCH-C e AMD3100.

La scelta della combinazione di farmaci da utilizzare nella HAART si basa sulla situazione clinica del paziente, sulle aspettative della sua aderenza al regime terapeutico, spesso complesso, e sulla carica virale.

Il numero dei linfociti CD4, rappresentativo del grado di immunodeficienza, e la viremia (numero di copie di HIV RNA nel sangue) sono i parametri accreditati di maggiore significato prognostico (Dybul *et al.*, 2002). La terapia antiretrovirale di solito ha inizio quando il numero dei CD4 scende al di sotto delle 350 cellule/mm³ e/o quando la carica virale è al di sopra delle 30.000 copie per ml ma occorre tenere presente che tali indicazioni sono soggette a frequente rivisitazione sulla base delle valutazioni statistiche che si rendono via via disponibili. I valori di questi due parametri sono quindi oggi controllati regolarmente nel paziente infetto allo scopo di valutare l'efficacia del regime terapeutico impiegato. L'obiettivo ideale del trattamento antiretrovirale è quello di abbassare quanto più possibile la carica virale, fino a portarla al di sotto dei limiti di rilevabilità dei test più sensibili (40-50 copie/ml).

In effetti, la HAART ha diminuito in modo sostanziale la morbilità e la mortalità correlate all'HIV portando nella maggioranza dei pazienti trattati a una diminuzione significativa della carica virale e un sostanziale e durevole aumento delle funzionalità immunitarie (Palella *et al.*, 1998). Proprio sulla base di risultati di questo tipo, la comunità scientifica aveva sostenuto la strategia di un energico approccio terapeutico per tutti i pazienti, sperando che una soppressione completa della replica virale, accompagnata dal fisiologico turnover degli elementi cellulari infetti, avrebbe condotto alla risolutiva eradicazione dell'infezione. In verità, tale ipotesi è stata in seguito chiaramente confutata a causa della persistenza della moltiplicazione virale in vari tipi cellulari (macrofagi, alcune cellule CD4 di memoria) e in distretti anatomici (sistema nervoso centrale, linfonodi, apparato genitale) difficilmente raggiungibili da parte dei farmaci antiretrovirali (Siliciano *et al.*, 2003). In mancanza della possibilità di eradicare l'infezione, la HAART si propone dunque come terapia a tempo indefinito nell'intento di bloccare la progressione dell'infezione. La cronicità della terapia pone però problematiche legate a fenomeni di tossicità a lungo termine (ben più gravi della tossicità acuta) per la maggior parte degli antiretrovirali (Carr *et al.*, 2000). Inoltre molti regimi terapeutici di combinazione, soprattutto quelli utilizzati all'inizio dell'era HAART, presentano tempi e modi di somministrazione assai gravosi da rispettare (Ostrop *et al.*, 2000). L'insieme di questi due fattori, tossicità e difficoltà di aderenza, unitamente ad una certa variabilità individuale della farmacocinetica (soprattutto per i PI) (Van Heeswijk *et al.*, 2001), comporta in molti pazienti periodi di inadeguata esposizione al trattamento farmacologico con conseguente rischio di selezione di mutanti resistenti per la coesistenza fra la generazione delle varianti e la presenza di concentrazioni di farmaco subinibenti. In definitiva, sia le problematiche relative alla somministrazione della HAART (Max *et al.*, 2000), sia l'incapacità di sopprimere completamente la replica virale contribuiscono al fallimento virologico della terapia spesso accompagnata dalla selezione di mutanti farmaco-resistenti.

La resistenza farmacologica si instaura quando una molecola con una specifica funzione antagonista nei confronti di un determinato bersaglio

perde del tutto o in parte la sua efficacia, rappresentando quindi uno degli ostacoli principali al successo della terapia (Deeks, 2001; Loveday, 2001; Miller, 2001; Soriano *et al.*, 2002).

La pressione selettiva esercitata dai farmaci può essere assimilata a quella che il sistema immunitario esercita sulle quasispecie virali. Entrambe queste forze esercitano un'azione di selezione sulle varianti virali prodotte privilegiando in ogni momento quelle meno efficacemente riconosciute dalla risposta immunitaria o dall'attività antivirale dei farmaci. Lo sviluppo della farmacoresistenza quindi è articolato in un processo continuo di replicazione, mutazione, selezione e dipende sia da fattori strettamente connessi alla variabilità genetica che da una serie di fattori caratteristici del farmaco (Jackson, 1997):

1. livello di penetrazione del farmaco in alcuni distretti corporei
2. numero di mutazioni necessarie (barriera genetica) per lo sviluppo di resistenza
3. livello di aderenza al trattamento (un'aderenza subottimale crea le condizioni favorevoli alla selezione dei mutanti resistenti) (Braithwaite *et al.*, 2006).

Le mutazioni che interessano la PR si sviluppano a carico dei 20 aa della tasca idrofobica e causano resistenza riducendo l'affinità di legame tra l'inibitore e l'enzima. Altre mutazioni non riguardano direttamente il sito attivo ma coinvolgono altri meccanismi come :

- Alterazione nella catalisi enzimatica.
- Effetti sulla stabilità del dimero (la forma attiva della proteasi).
- Alterazioni nella cinetica di legame degli inibitori.
- Rimodellamento del sito attivo attraverso perturbazioni a lungo raggio.

Le mutazioni di resistenza finora identificate nella RT agiscono secondo due diversi meccanismi:

- 1) mutazioni che consentono all'enzima di discriminare tra gli NRTI e i substrati naturali durante la sintesi, prevenendo l'incorporazione del farmaco nella catena di DNA in formazione; con lo stesso principio di discriminazione sono selezionate le mutazioni che alterano la

struttura della tasca idrofobica di legame degli NNRTI, impedendolo;

- 2) mutazioni tramite cui l'enzima acquisisce o comunque incrementa notevolmente la capacità di rimozione degli NRTI incorporati, consentendo di riprendere la sintesi di DNA.

Le mutazioni sono solitamente distinte in mutazioni primarie o chiave o maggiori, responsabili del vero e proprio conferimento di resistenza e mutazioni secondarie o accessorie o minori, di per sé non in grado di determinare resistenza ma capaci di modularne l'entità in presenza delle mutazioni primarie (D'Aquila *et al.*, 2003). Mentre le mutazioni chiave interessano frequentemente zone vicine al sito attivo e/o al sito di legame del farmaco, le mutazioni accessorie possono interessare regioni anche lontane da tali siti. Spesso le mutazioni di quest'ultima categoria hanno il ruolo di ripristinare la funzionalità enzimatica, parzialmente compromessa in seguito alla selezione delle mutazioni primarie: per tale motivo le mutazioni accessorie sono anche definite compensatorie. La distinzione fra mutazioni primarie e secondarie è stata inizialmente adoperata per la PR, enzima nel quale circa la metà dei 99 codoni è sede di mutazioni correlate all'uso dei PI in vivo (Wu *et al.*, 2003), ma analoghi fenomeni di modulazione di resistenza e ripristino della funzionalità enzimatica sono stati in seguito caratterizzati anche nella RT (Gonzales *et al.*, 2003; Svicher *et al.*, 2006).

Mentre le terapie monofarmaco utilizzate nel primo periodo storico di impiego degli antiretrovirali (1987-1992) selezionavano con grande facilità ceppi virali resistenti, l'introduzione della terapia combinata ha nettamente procrastinato la comparsa di varianti farmacoresistenti, risultanti dall'accumulo progressivo di una serie di mutazioni in grado di compromettere l'efficacia di tutti o una buona parte dei farmaci che compongono il regime terapeutico. Tuttavia, l'insorgenza di fenomeni di resistenza nei confronti di un determinato farmaco può spesso causare la diminuzione di efficacia di altri farmaci della stessa classe (cross-resistenza). La cross-resistenza è stata subito evidente per gli NNRTI (Deeks, 2001), e poi, è stata individuata come fenomeno frequente in vivo

anche per i PI (Miller, 2001) e gli NRTI (Loveday, 2001). Il livello di cross-resistenza cresce in genere con l'aumento del numero di farmaci della stessa classe a cui il paziente viene esposto, compromettendo in buona parte l'efficacia dei successivi regimi terapeutici ('terapia di salvataggio'). Gli NRTI sono la classe per la quale i fenomeni di multiresistenza sono stati caratterizzati più tardivamente, anche in base a meccanismi mai descritti in precedenza. Quadri di resistenza di classe nei confronti degli NRTI sono stati identificati in associazione con inserzioni di 1-2 aminoacidi al codone 69 della RT (Larder *et al.*, 1999) oppure con uno specifico set di mutazioni basato sulla sostituzione della glutammina da parte della metionina in posizione 151 (Q151M) (Shirasaka *et al.*, 1995). Entrambi questi pattern sono stati riscontrati solo in una piccola percentuale (generalmente al di sotto del 5%) di pazienti trattati lungamente con NRTI, e il continuo monitoraggio di popolazione in varie zone geografiche non ha finora segnalato aumenti di incidenza. Tuttavia una serie di evidenze cliniche e di laboratorio ha progressivamente chiarito che molti ceppi possono presentare una ridotta suscettibilità a tutti gli NRTI a causa della presenza di una serie di mutazioni originariamente descritte come mutazioni di resistenza nei confronti della zidovudina (AZT) (M41L, D67N, K70R, L210W, K219E/Q, T215Y/F), il primo antiretrovirale reso disponibile fin dal 1987. Contrariamente alle previsioni, il meccanismo di resistenza all'AZT conferito da queste mutazioni non implica l'incapacità di scelta fra base naturale (timina) e farmaco, in modo da non incorporare quest'ultimo, bensì un aumento della funzione pirofosforolitica (reazione inversa della retrotrascrizione) che permette la rimozione di un substrato erroneamente incorporato (il farmaco appunto) e la conseguente ripresa della sintesi del DNA virale. Tale modalità di azione interessa quindi l'intera classe dei terminatori di catena, giustificando il cambiamento di denominazione da TAM 'thymidine analog mutations' a NAM 'nucleoside analog mutations' o NEM 'nucleoside excision mutations' (Miller *et al.*, 2001).

L'introduzione dell'enfuvirtide nella pratica clinica ha rappresentato una importante innovazione nel trattamento di pazienti infetti da HIV. Miglioramenti clinici rilevanti, sia in termini di recupero numerico dei

linfociti T CD4+ sia come riduzione di viremia, sono stati riportati nelle prime sperimentazioni cliniche su pazienti pesantemente pretrattati e per i quali i farmaci attivi avevano perduto l'efficacia terapeutica (Oldfield *et al.*, 2005). Trattandosi del primo farmaco di una nuova classe, era lecito attendersi la massima efficacia anche in pazienti sottoposti a molti regimi terapeutici basati su inibitori di RT e di PR. A ribadire il concetto della terapia antiretrovirale di combinazione, i risultati migliori si sono comunque osservati quando all'enfuvirtide si è associata la possibilità di somministrare almeno uno o due antiretrovirali verso cui la popolazione virale non sia ancora completamente farmacoresistente. La stessa considerazione è ricavata del resto anche dall'esito dei più recenti studi clinici nei quali sono stati adoperati i due PI di ultima generazione (tipranavir e darunavir), entrambi caratterizzati da profili di resistenza relativamente diversi da quelli dei precedenti farmaci della stessa classe (Naeger *et al.*, 2007; Poveda *et al.*, 2006)

In uno studio controllato con 71 pazienti pretrattati con PI ma naive per NNRTI, l'aggiunta dell'enfuvirtide ad un regime di base con abacavir, amprenavir con ritonavir a basse dosi (un metodo molto utilizzato per migliorare la farmacocinetica dei vari PI) ed efavirenz ha comportato nella maggioranza dei pazienti una riduzione della carica virale a meno di 400 copie per ml ed, inoltre, una riduzione di più di un log nella carica virale rispetto al baseline, risultati positivi se comparati con quelli ottenuti dai pazienti che ricevevano la stessa HAART senza l'aggiunta dell'enfuvirtide (Jacob, 2004).

Il TORO (T20 vs Optimized Regimen Only) 1, condotto nell'America del Nord ed in Brasile su 491 pazienti e il TORO 2, condotto in Europa ed Australia su 512 pazienti, sono stati i due studi di fase III che hanno in seguito confermato l'efficacia clinica di enfuvirtide (Nelson *et al.*, 2005; Raffi *et al.*, 2006). La necessità di somministrazione sottocutanea (con frequenti reazioni di ipersensibilizzazione nel sito di iniezione) ed il costo attualmente molto elevato limitano per ora l'utilizzazione del T20 ai pazienti la cui infezione risulta non più controllabile con le altre classi di farmaci (Rockstroh, 2004).

Analogamente a quanto avviene per gli altri farmaci antiretrovirali, nel paziente sottoposto a trattamento con enfuvirtide si sviluppano varianti farmaco-resistenti. La comprensione delle basi molecolari della resistenza al T20 è ancora incompleta (Miller, 2004). L'evoluzione della farmaco-resistenza al T20 è stata analizzata sia in vitro che in vivo (Sista, 2004). Negli esperimenti in vitro il virus è stato sottoposto in coltura a concentrazioni crescenti di farmaco che inducono la selezione di varianti farmaco-resistenti. I ceppi selezionati, poi analizzati tramite sequenziamento, mostravano mutazioni caratteristiche nelle posizioni 36-38 all'N terminale della gp41. Come dimostrazione dell'effettiva associazione tra la mutazione nella sequenza e l'insorgenza della farmaco-resistenza, le stesse mutazioni sono state successivamente introdotte nel ceppo virale di laboratorio NL4-3 tramite mutagenesi sito diretta ed anche in questo caso i virus chimerici dimostravano una ridotta sensibilità all'enfuvirtide.

L'insorgenza di varianti virali con ridotta sensibilità all'enfuvirtide recanti mutazioni alle posizioni 36-38 della gp41 è stata anche osservata in vivo in campioni clinici di pazienti trattati con enfuvirtide.

Il sequenziamento di questi campioni ha evidenziato che i cambiamenti associati all'evoluzione della farmaco-resistenza non sono solo ristretti ai tre amminoacidi di HR1 (G36, I38 e V39 → GIV) ma si estendono alle posizioni 36-45 della gp41, altamente conservate nei virus dei pazienti mai trattati con il T20, ad eccezione dell'incidenza del polimorfismo N42S (15% di incidenza) che però non contribuisce alla riduzione della sensibilità al farmaco. Le sostituzioni più comuni sono alle posizioni 36, 38, 40, 42 e 43 (Fig. 8).

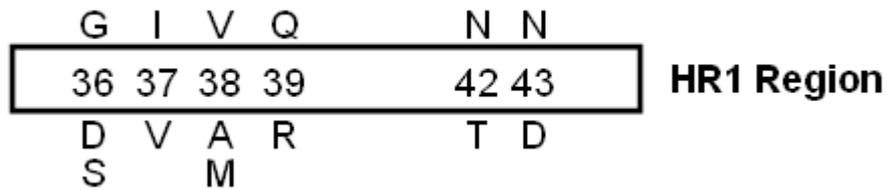


Fig 8 Sostituzioni aminoacidiche alle posizioni 36-45 della gp41 ad oggi correlate con la farmacoresistenza.

In uno studio successivo (Xu, 2005), sono stati esaminati 17 pazienti in cui si evidenziava risalita della carica virale conseguente ad un trattamento prolungato con il T20. Dai 62 campioni analizzati ottenuti tra le 5 e le 107 settimane di trattamento è emerso nuovamente che le mutazioni che inducono farmacoresistenza sono situate nelle posizioni 36-45 di HR1, aggiungendo mutazioni precedentemente non riportate come la N42Q/H and N43Q. Inoltre, nel 35% dei casi si è osservata la mutazione S138A nel dominio HR2 che si sviluppa almeno 8 settimane dopo l'inizio del trattamento con l'enfuvirtide di solito successivamente all'emergenza di mutazioni in HR1 (specialmente quelle alla posizione 43). La S138A aumenta i livelli di resistenza all'enfuvirtide di circa tre volte comparandola con la mutazione N43D da sola.

Un altro studio (Menzo, 2004) teso a valutare i patterns genotipici e fenotipici e la capacità replicativa dei mutanti resistenti all'enfuvirtide è stato condotto su campioni provenienti da 11 soggetti (7 con fallimento virologico e 4 no) che avevano ricevuto il composto per più di un anno in combinazione con regimi differenti. La selezione di una o più mutazioni che rientravano nella regione 36-45 è stata osservata in tutti i sette pazienti che non rispondevano più alla terapia, mentre, in due soggetti che utilizzavano in modo discontinuo la terapia, la reversione del genotipo a wild type è stata osservata entro 3 mesi dopo la sospensione della terapia. I cloni ricombinanti con la sequenza mutata mostravano una ridotta sensibilità all'enfuvirtide con un'IC50 che andava nell'intervallo da 0.6 a 12.8 µg/ml, rispetto agli isolati di riferimento la cui IC50 era 0.013 +/- 0.010 µg/ml. L'analisi del tropismo corecettoriale del virus ha indicato in 2/4

pazienti uno shift da R5 a R5/X4, in relazione con un aumento della resistenza fenotipica (Poveda, 2004). Altri dati sperimentali suggeriscono che gli isolati virali che usano CXCR4 sono invece più sensibili di quelli che usano CCR5 (fino a 30 volte) (Derdeyn, 2000). Queste informazioni preliminari suggeriscono quindi che la sensibilità all'enfuvirtide possa essere condizionata da un diverso tropismo per i corecettori. La zona più importante per la determinazione del tropismo è la V3 della gp120, fondamentale nel legame col corecettore: gli isolati che mostrano più variazione in questa zona sono anche quelli che mostrano differente sensibilità. L'approfondimento delle possibili variazioni di tropismo corecettoriale in seguito al trattamento con enfuvirtide assume particolare rilievo in considerazione della prossima disponibilità di farmaci antagonisti dei corecettori (Weber *et al.*, 2006).

Osservando la capacità replicativa dei virus ricombinanti recanti mutazioni di resistenza al T20 in test di moltiplicazione competitiva, è emerso che l'insorgenza di mutazioni di farmacoresistenza, oltre a rendere meno efficace l'azione del T20, comporta una riduzione della fitness replicativa virale. I virus con diminuita sensibilità al T20 sono, infatti, caratterizzati da un sensibile allungamento del tempo necessario per una singola replicazione. I mutanti al solo codone 38 sembrano inoltre associati alla conservazione di una buona risposta immunologica (Aquaro, *et al.*, 2006). Tuttavia, la prosecuzione della terapia con enfuvirtide tende a selezionare mutanti multipli con successiva perdita di questo beneficio (Melby *et al.*, 2006).

Test di Farmacoresistenza

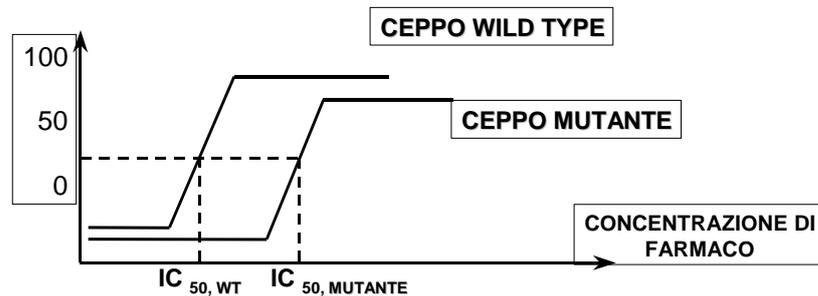
L'importanza della farmacoresistenza come causa di fallimento della terapia antiretrovirale trova testimonianza nella impressionante mole di dati prodotti nel campo della caratterizzazione dei mutanti negli ultimi 3-4 anni. Secondo le linee guida sulla terapia antiretrovirale (Hammer *et al.*, 2006), periodicamente aggiornate dalle varie commissioni internazionali e nazionali, l'esecuzione del test di resistenza è raccomandata (i) al fallimento della terapia (risalita della quantità di HIV-1 RNA) per

ottimizzare un nuovo trattamento, (ii) in gravidanza al fine di minimizzare il rischio di trasmissione verticale e (iii) nei pazienti mai trattati ('naive') per identificare l'eventuale trasmissione di ceppi resistenti (circa il 10% dei nuovi virus trasmessi negli Stati Uniti e in Europa è già farmacoresistente) (Little *et al.*, 2002; Wensing *et al.*, 2003). Per una corretta utilizzazione delle indicazioni fornite dai test di resistenza, è importante considerare queste ultime nel contesto della precedente storia terapeutica del paziente, incluse le informazioni sui fenomeni di intolleranza e sulla aderenza alla terapia.

I test di resistenza attualmente disponibili sono il test fenotipico e il test genotipico. Entrambi utilizzano la reazione di RT-PCR per amplificare la regione del gene *pol* codificante per la PR e per una parte della RT oppure la regione *env* comprendente la sequenza della gp41.

I test di fenotipizzazione permettono di valutare la capacità replicativa della popolazione virale in presenza dei farmaci antiretrovirali e forniscono una misura diretta della resistenza dei ceppi virali ad un determinato farmaco, evidenziando l'effetto netto delle diverse mutazioni sulla suscettibilità agli inibitori. In particolare, vengono determinate *in vitro* le concentrazioni di antiretrovirali che inibiscono la replicazione virale del 50% (IC₅₀, concentrazione inibente il 50% della replicazione) o del 90% (IC₉₀, concentrazione inibente il 90% della replicazione).

Il rapporto fra il valore di IC₅₀ del virus in esame e di un virus selvaggio preso come riferimento consente di esprimere il risultato del test in livello di resistenza ('fold change') (Fig. 9).



- IC_{50} = CONCENTRAZIONE INIBITORIA 50%
 - $IC_{50, MUTANTE} / IC_{50, WT}$ = MODIFICA IN N. VOLTE
- Es.: $IC_{50 (MUT)} = 5 \mu M$; $IC_{50 (WT)} = 0,5 \mu M$ Resistenza 10 X

Fig. 9 Determinazione del livello di resistenza in vitro tramite fenotipizzazione.

Il test fenotipico è attualmente disponibile a costi molto elevati come servizio da parte di aziende specializzate. I due sistemi più impiegati (PhenoSense®, Monogram Sciences, e Antivirogram®, Virco) differiscono nel modo in cui si ottiene il virus ricombinante e nella procedura di valutazione dell'attività replicativa del virus in presenza dei farmaci.

Il sistema della Virco prevede l'utilizzazione di un retrovirus ricombinante (Kellam *et al.*, 1994). Inizialmente, il saggio è stato utilizzato per valutare la sensibilità degli isolati virali agli inibitori della RT e successivamente è stato ottimizzato ed esteso ai PI (Hertogs *et al.*, 1998). Questo test prevede la produzione di virus attraverso la ricombinazione omologa fra la sequenza virale corrispondente alla regione *pol*, ottenuta tramite retrotrascrizione ed amplificazione del virus isolato da plasma del paziente, ed un genoma di HIV-1 caratterizzato dalla corrispondente delezione e contenuto in un plasmide di riferimento. La ricombinazione omologa avviene in seguito a cotrasfezione del prodotto di PCR e del plasmide provirale con la delezione in una linea linfocitaria CD4-positiva e porta alla produzione di virus chimerici contenenti la regione *pol* da analizzare per le farmacoresistenze. Il virus è quindi utilizzato per infettare

una linea cellulare linfoblastoide in presenza di dosi scalari di farmaco e la sensibilità agli inibitori è valutata tramite un saggio di vitalità cellulare.

Il sistema Phenosense® prevede l'inserimento della regione *pol* ottenuta dal virus in esame in un vettore caratterizzato da una delezione a livello del gene *env* e dalla presenza del gene della *luciferasi* come "reporter". A causa di questa interruzione nel gene *env*, il virus ricombinante può compiere un solo ciclo replicativo, poiché non è in grado di esprimere le proteine dell'envelope (gp120 e gp41, fornite in trans da un secondo vettore). Il virus ricombinante si ottiene trasfettando le cellule con il plasmide *env*-difettivo in cui è stato inserito il frammento genomico di derivazione clinica e con un plasmide esprime il gene *env*. Successivamente, il virus viene utilizzato per infettare cellule bersaglio, in presenza di concentrazioni crescenti di farmaco, e la sensibilità agli inibitori è valutata tramite il saggio della luciferasi (Petropoulos *et al.*, 2000).

A fronte degli innumerevoli vantaggi dei vettori ricombinanti (dispensazione dalla necessità di isolare il virus, standardizzazione e automazione), entrambi i metodi sono tuttora deficitari nella completa ricostruzione di tutti i siti di clivaggio della PR poiché alcuni di questi sono dati dallo stesso vettore, con la possibilità che variazioni di queste sequenze sviluppatesi in vivo come mutazioni di compensazione non siano saggiate. Il principale limite dei test fenotipici riguarda la determinazione di un preciso valore di soglia (incremento della IC₅₀) oltre cui si abbia l'effettiva insorgenza della farmacoresistenza in vivo. Inizialmente i test stabilivano valori di soglia uguali per tutti i farmaci, scelti in base alla riproducibilità del saggio (cut-off sperimentale). Successivamente, sono stati utilizzati valori di soglia differenziati per i vari farmaci derivati dallo studio della variabilità della suscettibilità di molti ceppi virali provenienti da pazienti mai esposti alla terapia antiretrovirale (cut-off biologico) (Harrigan *et al.*, 2001). Infine è stato determinato, almeno per alcuni farmaci, il valore soglia di suscettibilità oltre il quale la risposta in vivo all'antiretrovirale inizia a decrescere (cut-off clinico) (Hammer *et al.*, 2006).

Il test genotipico stima la suscettibilità della popolazione virale ai farmaci sulla base delle mutazioni individuate e delle conoscenze sulla

correlazione fra queste e i fenomeni di resistenza. Sono stati allestiti a questo scopo sistemi di individuazione di una serie di mutazioni specifiche ('point mutation assay') mediante tecniche di ibridazione differenziale ma la continua crescita del numero di mutazioni ritenute importanti per la farmacoresistenza ha progressivamente esortato ad utilizzare protocolli di sequenziamento completo delle regioni genomiche di interesse. I 'point mutation assay', pur mantenendo una buona praticità e una notevole sensibilità nell'individuare popolazioni minoritarie, sono inoltre soggetti ad un certo numero di eventi di mancato riconoscimento sia da parte della sonda per il wild type sia da parte di quella per la variante resistente a causa di estesi polimorfismi nella regione immediatamente circostante (Puchhammer-Stockl *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2000). I sistemi di sequenziamento sono stati progressivamente ottimizzati fino a rendere disponibili due saggi commerciali avvalorati da approvazione FDA per uso diagnostico. Entrambi questi sistemi (Trugene®, Bayer, e Viroseq®, Abbott) dichiarano una buona sensibilità (amplificazione e sequenziamento a partire da almeno 1000 copie di HIV RNA per ml di plasma) e comprendono tutto l'occorrente per estrazione di RNA da plasma, RT-PCR, sequenziamento e software di interpretazione del genotipo. L'interpretazione dei risultati del genotipo risulta alquanto complessa poiché devono essere considerati gli effetti di ogni mutazione sulla sensibilità ai vari farmaci (sono oltre 100 le mutazioni implicate) ed anche le interazioni tra le differenti mutazioni che possono modulare i livelli di resistenza. In genere i sistemi interpretativi sono periodicamente aggiornati sulla base del parere di pannelli di esperti. Attualmente sono disponibili molti sistemi, in parte accessibili liberamente su web, i quali mostrano buon accordo sulla maggioranza dei genotipi ma anche notevoli discrepanze per situazioni particolari, soprattutto inerenti i farmaci di più recente introduzione sul mercato (Schmidt *et al.*, 2002) e alcuni sottotipi virali (Snoeck *et al.*, 2006).

Le problematiche che interessano tutti i saggi di farmacoresistenza sono relative alla standardizzazione della metodologia e alla difficoltà nell'individuare le popolazioni minoritarie farmacoresistenti. Il polimorfismo di HIV-1 rappresenta inoltre un ostacolo rilevante all'esecuzione dei saggi

di resistenza, sia fenotipici sia genotipici. Infatti, l'efficienza della fase di amplificazione della sequenza da esaminare può risentire del mancato riconoscimento di regioni genomiche divergenti dal 'consensus' basato sulle informazioni reperibili nelle banche delle sequenze. In particolare, le infezioni da sottotipi non-B sono associate a maggiori problemi di riconoscimento del bersaglio da parte dei primer di amplificazione e/o sequenziamento (Pillay *et al.*, 2002; Holguin *et al.*, 2003; Jagodzinski *et al.*, 2003). Del resto le stesse difficoltà sono causa di mancata individuazione del genoma virale o della sottostima del livello di HIV-1 RNA nei saggi diagnostici e di monitoraggio della viremia (Parekh *et al.*, 1999; Amendola *et al.*, 2002), problema reso via via meno rilevante con gli aggiustamenti periodici dei test (Swanson *et al.*, 2006). E' infine ovvio che, al di là dell'impiego del test fenotipico o genotipico, l'utilità della conoscenza del profilo di resistenza è strettamente dipendente dalla disponibilità di opzioni terapeutiche valide, cioè dalla possibilità di adoperare farmaci verso i quali non siano già presenti fenomeni di cross-resistenza (Dionisio *et al.*, 2001).

La scelta fra test fenotipico e genotipico alla luce dei rispettivi vantaggi e svantaggi è argomento in continuo dibattito (Tab. 2). La considerazione delle due tipologie di saggi ha avuto notevole evoluzione nel corso degli ultimi anni. Nonostante il test fenotipico generi un risultato direttamente rappresentativo delle alterazioni di suscettibilità agli antiretrovirali, molte evidenze indicano che la resistenza in vitro e quella in vivo possono seguire percorsi diversi e, soprattutto, che la capacità del saggio fenotipico di misurare le variazioni di suscettibilità è ben diversa per farmaci diversi. Il test ha un tempo di esecuzione relativamente protratto (circa 2-4 settimane) e un costo reso molto impegnativo dalla sua complessità. Per lo stesso motivo, i sistemi di fenotipizzazione dotati di un buon livello di riproducibilità sono offerti da aziende specializzate come servizio esterno. I saggi genotipici hanno invece tempi e costi più adatti alla routine clinica e possono essere eseguiti direttamente nell'ambito del centro che necessita delle informazioni sulla farmacoresistenza. Rimane vero che, in presenza di quadri mutazionali particolarmente complessi, la genotipizzazione non riesce a soppesare l'impatto di tutte le interazioni fra mutazioni

nell'alterazione del profilo di resistenza ma la disponibilità di un crescente numero di evidenze di correlazione fra genotipo e fenotipo e soprattutto fra genotipo e risposta in vivo al trattamento rende l'esercizio dell'interpretazione del genotipo sempre meno aleatorio e sempre più affidabile. Se i test fenotipici sono dunque uno strumento fondamentale per le iniziali valutazioni del profilo di resistenza dei nuovi farmaci, la pratica clinica è ormai universalmente supportata dai test genotipici.

Tabella 2 Caratteristiche dei test di resistenza genotipici e fenotipici.

| Caratteristica | Genotipo | Fenotipo |
|---|---|--|
| Durata test | 1-2 settimane | 2-4 settimane |
| Costo | Medio | Molto elevato |
| Preparazione tecnica richiesta | Media | Molto elevata |
| Tipo di risultato | Previsione | Misura diretta |
| Sensibilità | Specie >20% della popolazione totale | Specie >20-50% della popolazione totale |
| Discriminazione sensibile/resistente | Dipendente dal sistema interpretativo | Dipendente dal cut-off stabilito |
| Riproducibilità interlaboratorio | Elevata in specifici studi Scadente in studi estesi di qualità | Buona (aziende specializzate) |
| Tempestività nel rilevamento della resistenza | Individuazione precoce di quadri iniziali di resistenza | Individuazione di resistenza in presenza di quadri consolidati |

In un campione di sangue, materiale tipicamente disponibile per la routine clinica, il plasma è normalmente utilizzato per valutare la farmacoresistenza, in base al presupposto che esso contenga la popolazione virale in fase attiva di replicazione. Il materiale genetico virale può inoltre essere ottenuto anche dai PBMC, in forma di DNA provirale o

non integrato ovvero di RNA genomico e messaggero in formazione. L'utilizzazione degli estratti di DNA dai PBMC configura la possibilità di analizzare sequenze rappresentative dell'intero archivio dei genomi virali prodotti nel corso dell'infezione ma anche quella di non potere individuare varianti farmaco-resistenti di recente produzione, presenti come forma prevalente nel plasma ma possibilmente non ancora introdotte nella maggioranza delle PBMC (Venturi *et al.*, 2002). E' anche possibile che varianti virali divergenti colonizzino preferenzialmente elementi cellulari diversi (es. macrofagi, linfociti T, cellule dendritiche) e distretti anatomici diversi (sistema nervoso centrale, mucosa intestinale, apparato genitale) (Venturi *et al.*, 2000; Poles *et al.*, 2001).

Polimorfismo genetico

Sulla base dell'analisi filogenetica di numerosi isolati ottenuti da diverse regioni geografiche, HIV si può suddividere in tipi, gruppi, sottotipi, sotto-sottotipi, forme ricombinanti circolanti (CRF) e ricombinanti unici (<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/REVIEWS/nomenclature/Nomen.html>).

L'elevato grado di variabilità genetica di HIV è potenzialmente in grado di influenzare le modalità di infezione cellulare e di trasmissione, nonché l'interazione virus-ospite e l'andamento clinico dell'infezione stessa. Non solo la popolazione virale presente in un individuo differisce da quella di un altro soggetto (eterogeneità "interhost") ma varia anche in uno stesso individuo (evoluzione "intrahost"), sia nel corso del tempo sia in ogni determinato momento nell'ambito di una popolazione mista costituita da molteplici quasispecie virali (Lukashov, 1998). Dall'inizio degli anni 90, grazie alla progressiva disponibilità di informazioni di sequenza relativa a ceppi di varia provenienza geografica, è risultato sempre più evidente che all'apparente relativa omogeneità fra le varianti isolate in Europa e Nord America faceva riscontro una notevole diversificazione dei genomi virali caratterizzati in America Latina, sud-est asiatico e soprattutto in Africa (Janssens *et al.*, 1997). Ciò ha indotto ad una continua rivisitazione dell'inquadramento dei raggruppamenti di HIV-1. Il sistema di nomenclatura attuale ripartisce le sequenze virali sulla base dell'omologia

in varie regioni del genoma, riconoscendo tre 'gruppi', M (major), O (outlier), N (non-M/non/O). Il gruppo M comprende oltre il 95% dei ceppi caratterizzati e include a sua volta ulteriori suddivisioni denominate 'sottotipi' (A, B, C, D, F, G, H, J, e K) approssimativamente equidistanti l'uno dall'altro. I sotto-sottotipi (A1/A2/A3 e F1/F2 rientrano in questa definizione, sostituendo i precedenti sottotipi A e F) rappresentano ulteriori differenziazioni di un particolare sottotipo, non sufficientemente distanti dal punto di vista filogenetico da giustificare la definizione di un raggruppamento autonomo (Peeters, 2000). Anche il sottotipo B e quello D dovrebbero essere considerati come sottotipi appartenenti ad un singolo sottotipo ma per ragioni storiche è difficile modificare questa nomenclatura (Peeters, 2003).

Nei paesi sviluppati (Europa, Nord America, Australia) il sottotipo B è da sempre predominante, anche se recenti evidenze indicano una crescente penetrazione di altri sottotipi in vari paesi europei (Fig.10).

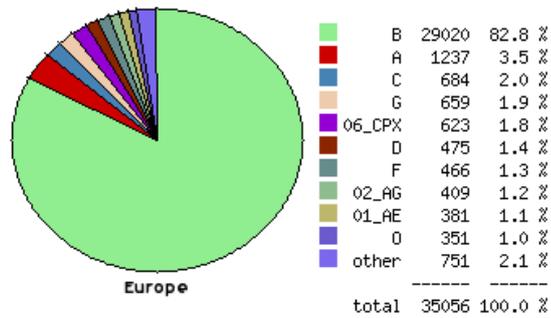
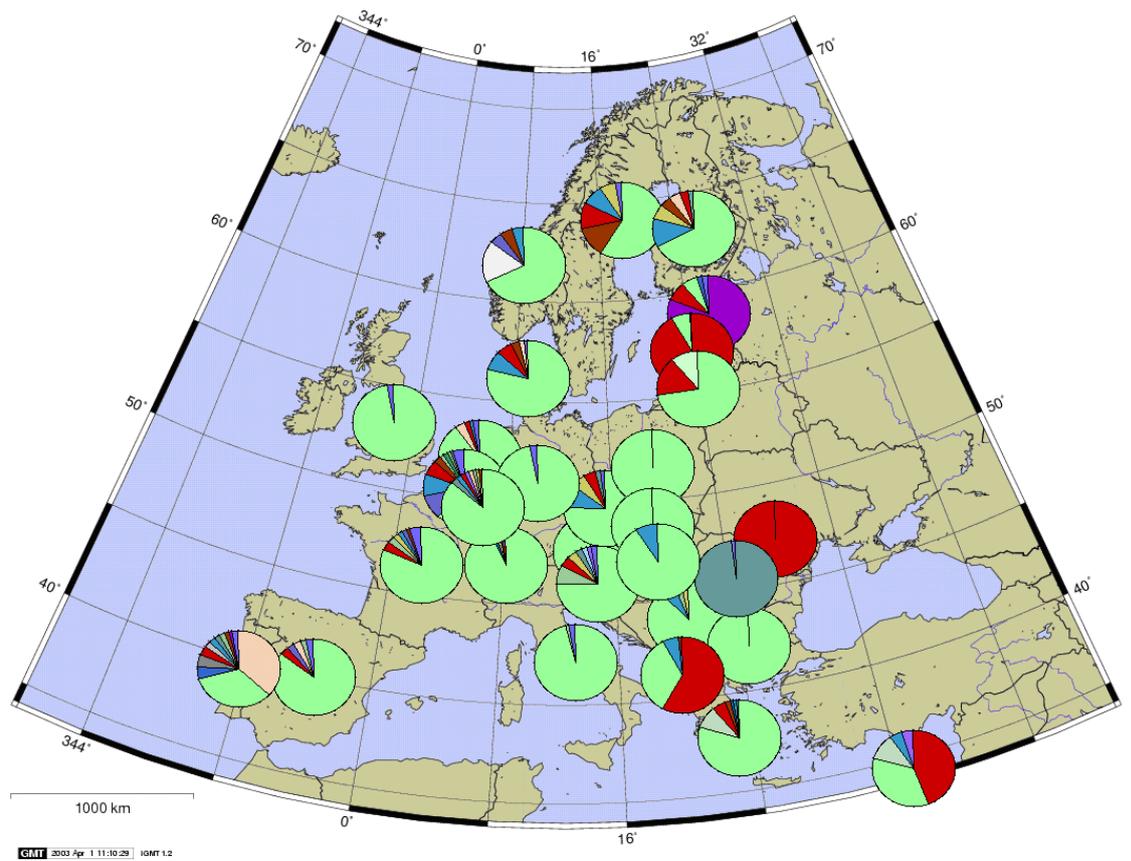


Fig. 10 Mappa europea dei sottotipi secondo il Los Alamos National Laboratory(http://hiv-web.lanl.gov/components/hiv-db/new_geography/geography.comp)

I sottotipi A prevalgono nell'Africa Centrale; i C in Sudafrica, Cina, India, Nepal; i D sono limitati a casi sporadici nell'Africa Centrale; gli F sono stati osservati in Africa Centrale, Sud America e Europa Orientale; i G in Africa Orientale e Occidentale; gli H solo in Africa centrale; i J in origine descritti esclusivamente in America Centrale ma in seguito caratterizzati anche in Spagna (Fig.10); i K sono stati identificati nella Repubblica Democratica del Congo e in Cameroon. E' evidente che, per motivi lontani dall'essere completamente chiariti ma probabilmente anche connessi con le origini stesse di HIV-1, l'Africa rappresenta il maggiore serbatoio dell'infezione (Fig. 11), sia da un punto di vista numerico sia in termini di diversità genetica. In questo continente sono stati infatti individuati non solo tutti i sottotipi HIV-1 del gruppo M, ma anche le rare varianti dei gruppi O e N (Cameroon ed Africa Centrale) e il tipo 2 di HIV, meno patogeno di HIV-1 e peculiarmente confinato nella zona del Golfo di Guinea, nonostante l'apparente uguaglianza delle vie di trasmissione (Peeters, 2003).

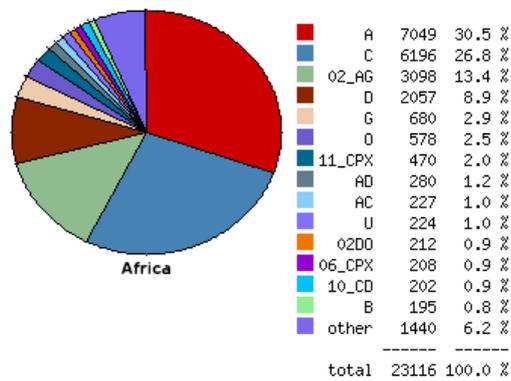
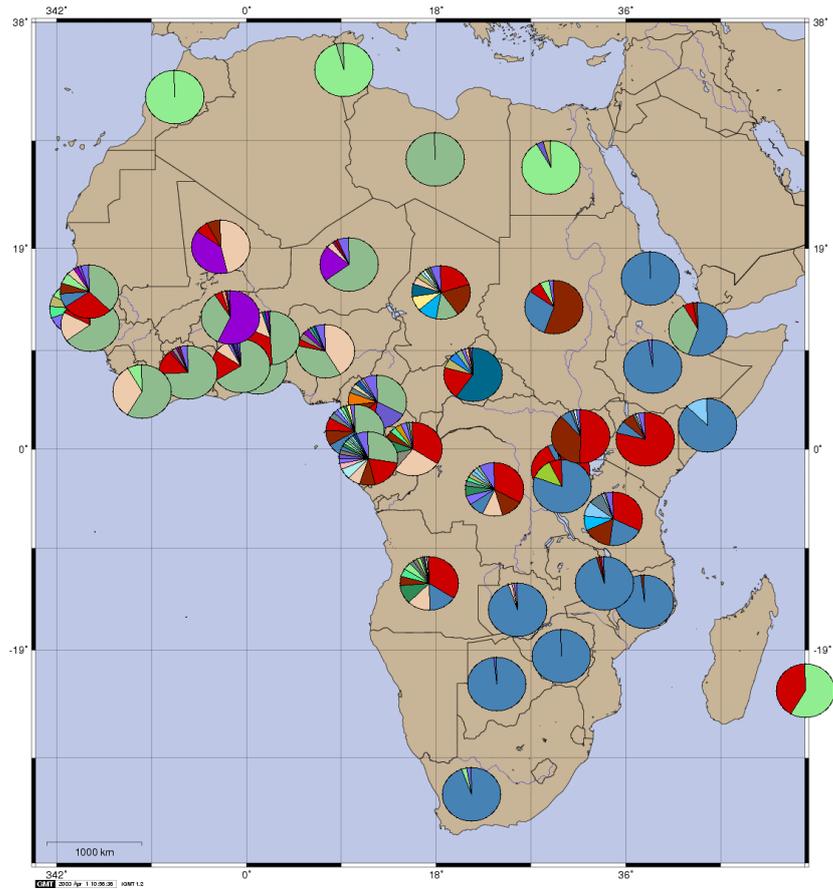
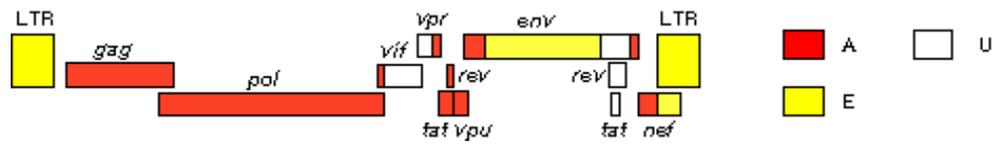


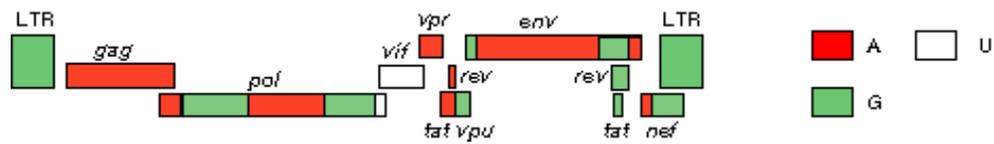
Fig. 11 Distribuzione dei sottotipi di HIV-1 in Africa
 (http://hiv-web.lanl.gov/components/hiv-db/new_geography/geography.comp)

All'origine del polimorfismo di HIV stanno (i) l'attività della RT, incline ad errori e incapace della loro correzione per la mancanza di una funzione di 'proofreading', (ii) l'elevato turnover della replicazione, quantificato nella produzione di circa 10^{10} particelle virali nell'arco di una sola giornata in assenza di terapia e (iii) la propensione alla ricombinazione genetica (Spira *et al.*, 2003; Perelson *et al.*, 1996; Coffin, 1996). Poichè il virione neoformato racchiude due copie di RNA a singolo filamento, l'infezione di una stessa cellula da parte di più varianti configura in effetti la possibilità di generare un genoma ricombinante composto da regioni appartenenti a ceppi diversi. Fenomeni di tale genere che interessino varianti di diverso sottotipo sono alla base della formazione di ceppi definiti 'mosaico', nei quali coesistono regioni genomiche ad elevata omologia con sottotipi diversi (Peeters *et al.*, 2000). Alcuni di tali ricombinanti hanno avuto notevole successo epidemiologico, meritando la denominazione di 'circulating recombinant forms' (CRF), altre costituiscono reperti isolati ('unique recombinant forms', URF). Sono state finora ufficialmente riconosciute 34 diverse CRF ed altre sono in fase di caratterizzazione, a testimonianza del ruolo della ricombinazione nell'evoluzione della pandemia (Fig.12).

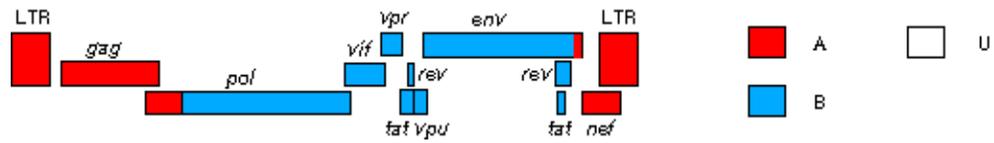
CRF01_AE



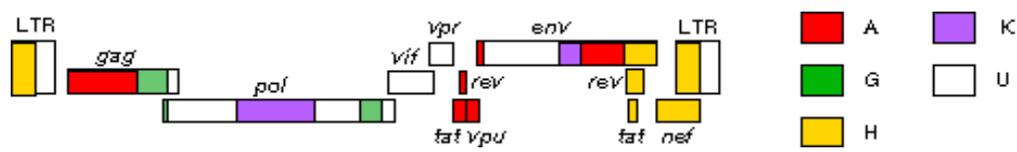
CRF02_AG



CRF03_AB



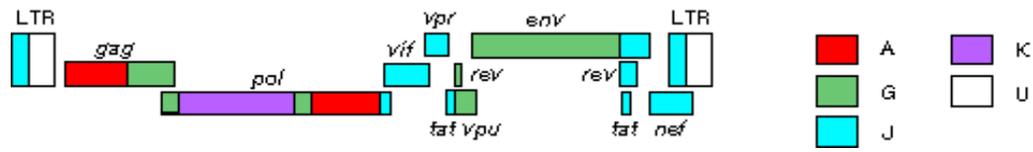
CRF04_cpx



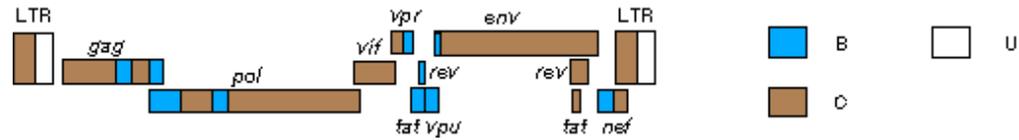
CRF05_DF



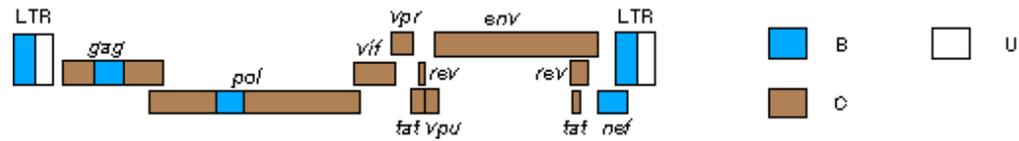
CRF06_cpx



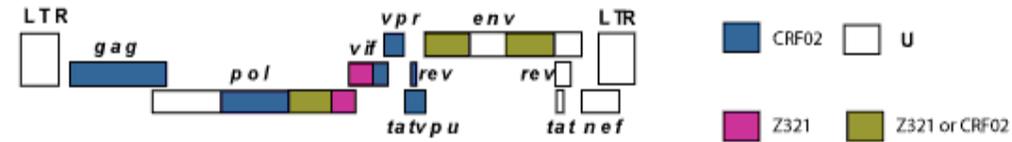
CRF07_BC



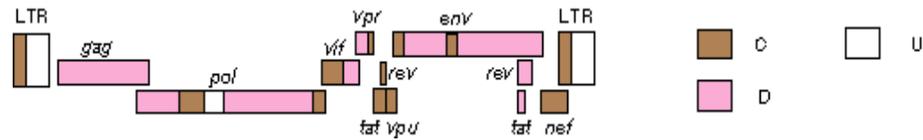
CRF08_BC



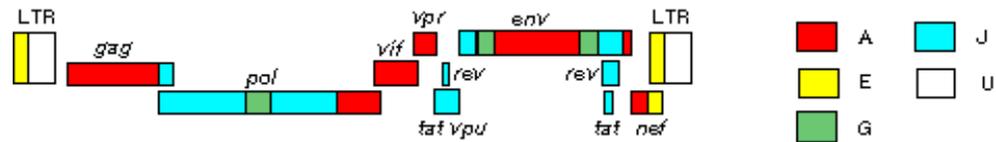
CRF09_cpx



CRF10_CD

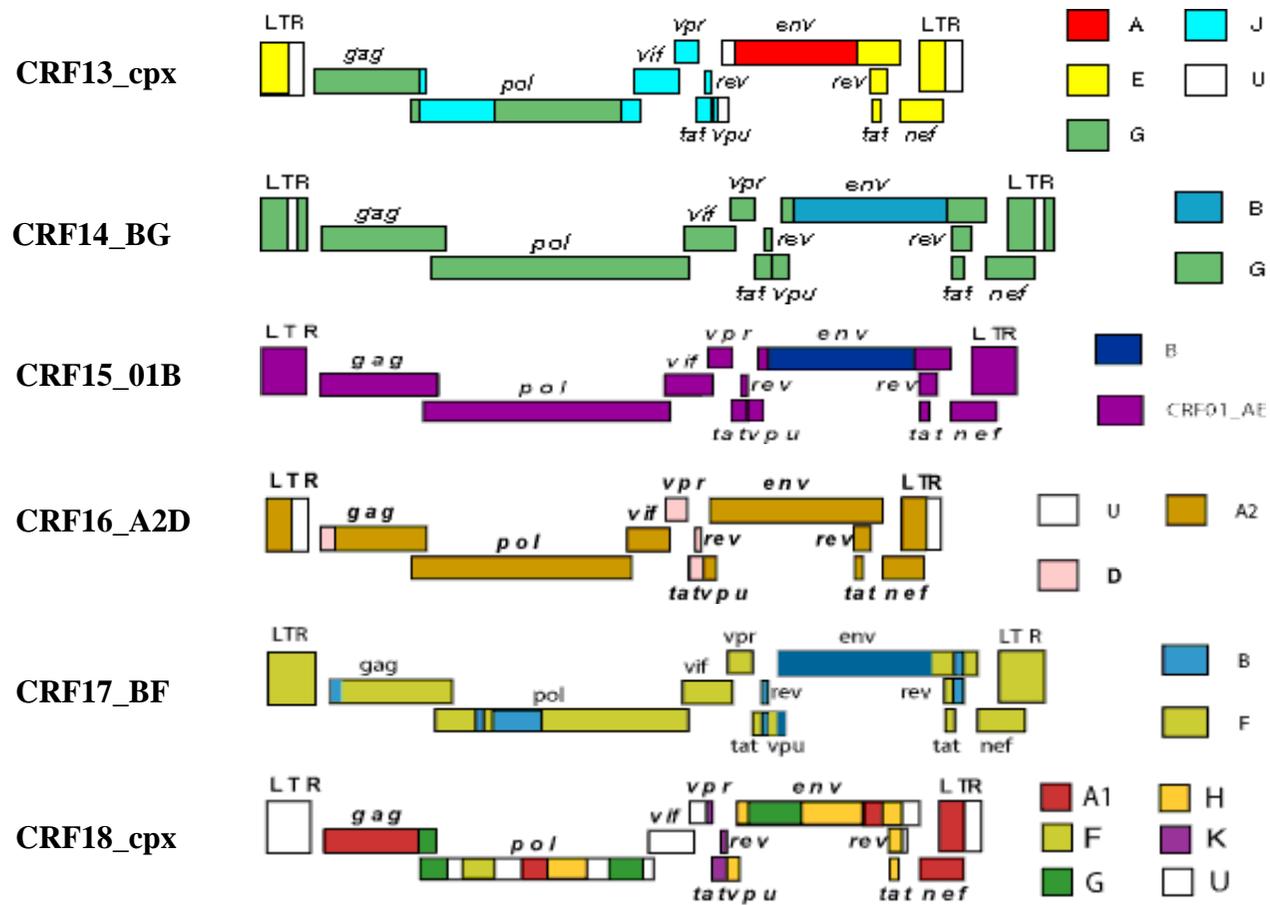


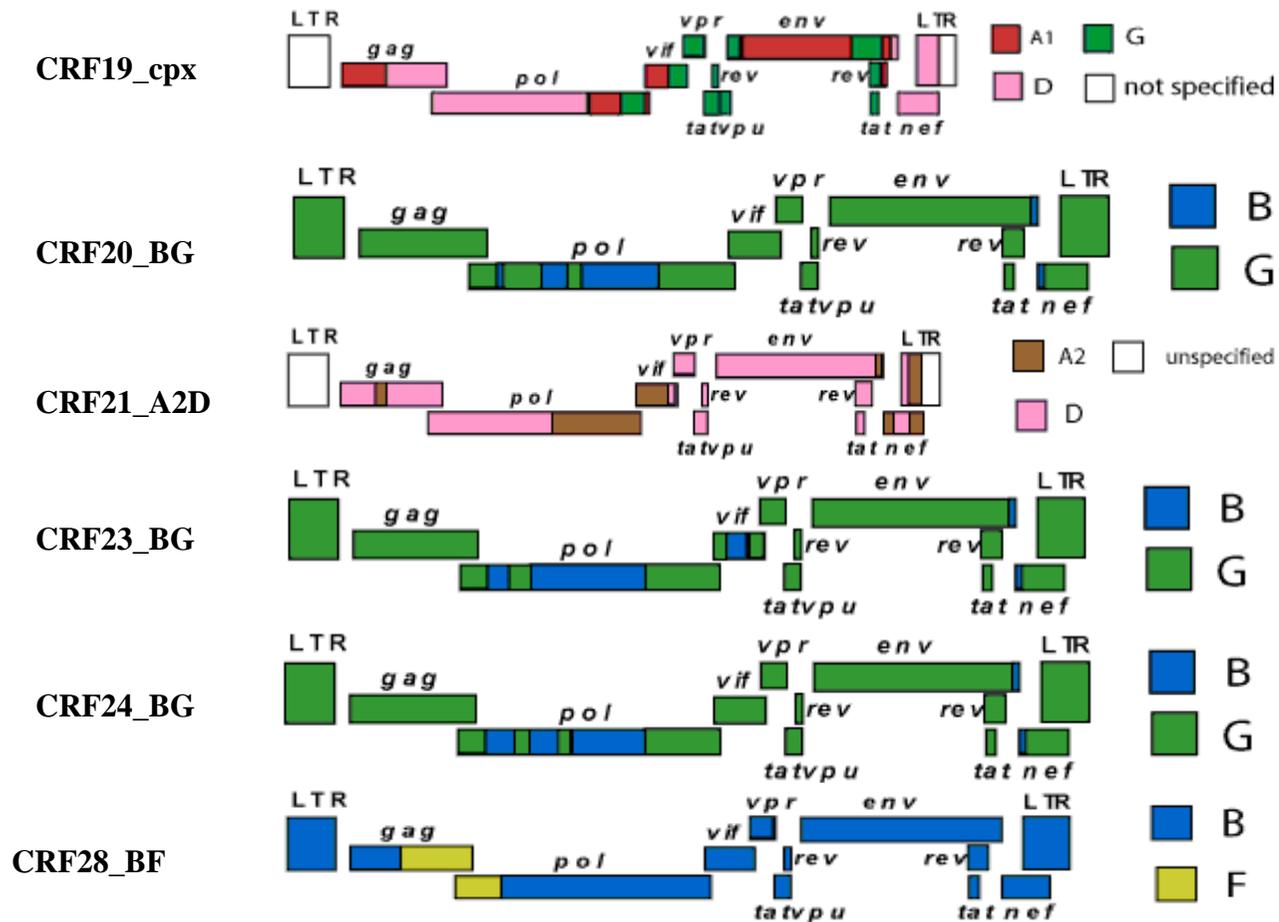
CRF11_CPX



CRF12_BF







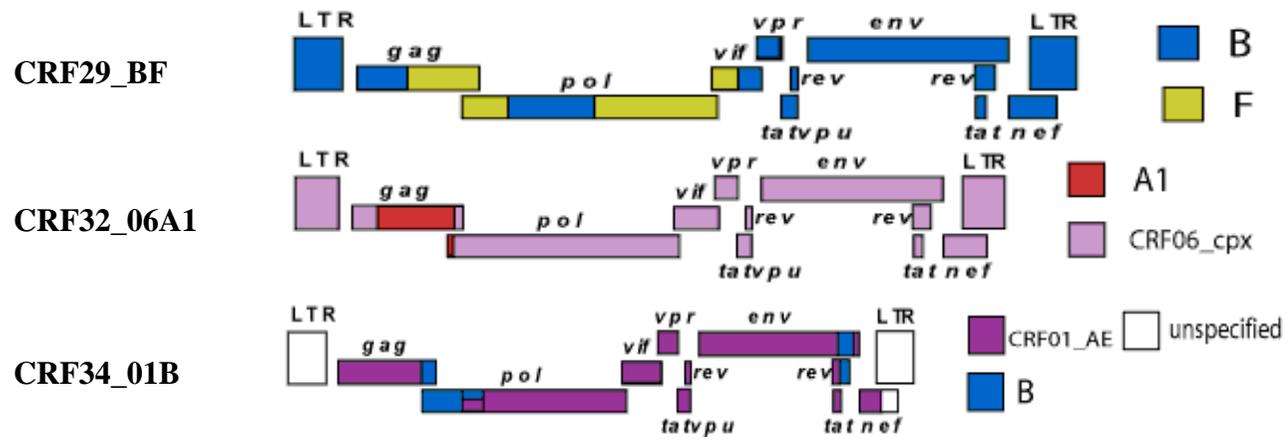


Fig. 12 CRF di HIV-1 fin' ora caratterizzate.

Il polimorfismo di HIV ha un impatto notevole in molti aspetti della pratica clinica e della ricerca; nella diagnostica può accadere che un sottotipo non-B non venga adeguatamente rilevato. In passato sono state segnalate difficoltà di identificazione di HIV non-B mediante test sierologici (Apetrei *et al.*, 1996); il fenomeno è più probabile nell'ambito di test di tipo molecolare allorché anche solo uno dei primers utilizzati nella reazione di amplificazione non riconosce il genoma virale a causa della divergenza del bersaglio. Anche i test di quantificazione della carica virale devono essere continuamente aggiornati per migliorare la sensibilità e specificità dei reagenti utilizzati in base alla distribuzione dei sottotipi nel territorio d'interesse; erronei risultati dei test potrebbero influire negativamente nel monitoraggio dell'infezione e della terapia (Gottesman *et al.*, 2004).

MATERIALI E METODI

Servizio di Monitoraggio HIV dell'Università di Siena

Presso il Dipartimento di Biologia Molecolare dell'Università di Siena è operativo dal 1990 il Servizio di Monitoraggio dell'infezione da HIV. A partire dal 1993 è stato reso disponibile il test di genotipizzazione mediante sequenziamento della regione *pol* e stima della farmacoresistenza agli antiretrovirali. Il notevole numero di richieste in questo contesto ha portato alla costruzione di una banca dati che attualmente comprende quasi 9000 sequenze di RT e altrettante di PR. Dal 2005 è stato sviluppato anche il test di sequenziamento del gene *env* per la valutazione di resistenza ad enfuvirtide. La stretta collaborazione con la maggior parte delle numerose cliniche afferenti ha reso possibile incorporare nella banca dati anche le notizie cliniche e di follow-up dei pazienti per i quali sono stati eseguiti i test di genotipizzazione. Questa attività di centralizzazione dati è tuttora in corso nell'ambito del progetto multicentrico ARCA, coordinato dallo stesso Dipartimento, che mira alla costruzione di modelli predittivi della risposta virologica al trattamento sulla base del genotipo (www.hivarca.net).

Trattamento dei campioni clinici

I campioni di sangue sono stati separati in plasma (da cui viene estratto l'RNA virale) e cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC, da cui viene estratto il DNA) mediante una centrifugazione su gradiente di Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech Italia, Cologno Monzese, Italy). Tutti gli estratti sono stati archiviati e conservati a -20°C (DNA) o a -80°C (RNA).

Per l'estrazione dell'RNA da plasma viene utilizzato un sistema che impiega un adsorbimento su resina in colonna (Qiamp Viral RNA, Qiagen, Hilden, Germany). Un aliquota di 1 ml di plasma è stata sottoposta ai vari

passaggi di lisi, adsorbimento, lavaggio ed eluizione come previsto dal produttore del sistema. Il volume di eluizione finale è di 120 µl, e l'estratto di RNA così ottenuto rappresenta un concentrato 8.3x rispetto al materiale di partenza.

Studio dei primer di amplificazione e sequenziamento

Per il sequenziamento della regione di HIV-1 codificante per l'intera PR e per gli aminoacidi 1-240 della RT, viene utilizzata una metodica 'in-house' con primers di amplificazione e di sequenziamento modificati al fine di ottenere un singolo prodotto di PCR di 1.353 paia di basi (Peduzzi et al., 2002). In breve, 20 µl di RNA estratto da plasma vengono retrotrascritti ed amplificati (Superscript RT for long templates, Invitrogen, S. Giuliano Milanese, Italy), con i primers PRO1 (senso; 5' AAAAGGGCTGTTGGAAATGTG 3', posizione 2017-2038 su HIV-1 HXB2) e P220 (antisenso; 5' TTCTGCTATTAAGTCTTTTGMTGGGTCRTA 3'; 3504-3522). Un secondo ciclo di PCR 'nested' viene quindi eseguito utilizzando 2 µl del prodotto dell'amplificazione esterna come template e i primers interni P95 (senso; 5' TACTGARAGACAGGCTAATTTTTTA 3'; 2066-2090) e P218 (antisenso; 5' ACTAACTTCTGTATRTCATTGACAGT 3'; 3305-3332). Il prodotto della PCR interna viene visualizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio 3% (Nusieve 2,4%-Seakem 0,6%,) e quindi viene utilizzato, senza alcuna purificazione, come template per una reazione di sequenziamento ciclico bidirezionale (DYEnamic Direct Cycle Seq kit, Amersham Pharmacia Biotech Italia, Cologno Monzese, Italy), impiegando contestualmente una coppia di primer, uno di senso IR24 (5' TTYCTTCAGARCAGACCAGAGCCAAC 3'; 2131-2160) e l'altro di antisenso, IR15 (5' CTAAYTTCTGTATRTCATTGACAGTCCA 3'; 3303-3330) con diversa marcatura (rispettivamente IRD800 e IRD700).

Le reazioni di terminazione vengono corse su gel di poliacrilamide/urea su un sequenziatore automatico LI-COR modello IR2, e direttamente analizzate con il software E-seqV2 e AlignIR.

Sequenziamento di regioni gag ed env

Al fine di caratterizzare più dettagliatamente alcuni ceppi risultati di particolare interesse in base alla sequenza della regione *pol*, sono stati amplificati e sequenziali anche alcuni frammenti dei geni *gag* ed *env*. Una regione di 971 paia di basi del gene *gag* e una regione di 1351 paia di basi del gene *env* sono state sottoposte a 'nested' PCR con protocollo analogo a quello descritto sopra, utilizzando i primers esterni P137 (5' TAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTC 3' 777-806) e P138 (5' TCATTTGRTGTCCTTCCTTTCCACATTTCCA 3' 2029-2059) per *gag*, P148 (5' GGTATCYTTTGAGCCAATTCCYATACA 3' 6845-6871) e P153 (5' AACGACAAAGGTGAGTATCCCTGCCTAA 3' 8347-8374) per *env* e quelli interni P139 (5' TATARATTA AACATMTAGTATGGGCAAGC 3' 874-903) e P140 (5' TCCTCCC ACTCCCTGACATGCTGTCATC 3' 1827-1844) per *gag* e P169 (5' AAATGTCAGCACAGTACAATGYACA 3' 6944-6968) e P155 (5' TCCTACTATCATTATGAATATTTTTATATA 3' 8265-8294) per *env*. Il sequenziamento dei frammenti ottenuti è stato effettuato mediante i primers IR25 (5' GCTGT TAAATGGCAGTCTAGCAGAA 3' 7011-7035) e IR46 (5' TACTATCATTATGAATATTTTTATATACCA 3' 8265-8291) nella regione *env* e IR34 (5' ACTCCCTGACATGCTGTCATCAT 3' 1832-1854) e IR35 (5' ACATMTAGTATGGGCAAGCAGGGA 3' 885-908) nella regione *gag*.

Analisi filogenetica per la caratterizzazione dei sottotipi e delle CRFs

La designazione di sottotipo o CRF è stata effettuata in prima istanza attraverso il calcolo dell'omologia di sequenza fra le sequenze in esame e i ceppi di riferimento rappresentativi di tutte le forme codificate. Tale processo è incorporato nel software AntiRetroScan, sviluppato presso il Dipartimento di Biologia Molecolare e adibito all'identificazione delle mutazioni di resistenza e alla stima di suscettibilità agli antiretrovirali (Zazzi *et al.*, 2004). Ogni sequenza risultata con omologia massima nei confronti di sottotipi non-B è stata analizzata tramite analisi filogenetica. Un allineamento di una sequenza *pol* (297 bp della PR e le prime 720 bp della RT) per ciascuno dei pazienti con isolati definiti non-B dalla prima analisi è stato generato automaticamente a partire dal database del Servizio di Virologia. L'allineamento con 2-5 sequenze di riferimento per ciascun sottotipo e CRF (raccolte nel database del sito Internet del Los Alamos National Laboratory) è stato quindi effettuato con il programma BioEdit, generando gli specifici dataset per l'analisi filogenetica.

Il dataset di sequenze è stato analizzato utilizzando i programmi SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR e CONSENSE contenuti nel pacchetto software PHYLIP (ver. 3.65). Il programma DNADIST calcola le distanze genetiche tra le sequenze di ogni dataset, generando una matrice numerica secondo il sistema di Kimura a 2 parametri, a sua volta utilizzata dal programma NEIGHBOR per generare l'albero filogenetico reale in cui le lunghezze dei rami rispecchiano le effettive distanze evolutive fra ciascuna sequenza analizzata. Il programma NEIGHBOR può utilizzare algoritmi diversi per i suoi calcoli, in questo studio è stato applicato il modello Neighbor-Joining. La funzione del programma SEQBOOT è quella di creare dei replicati delle sequenze in esame, in modo da ottenere un supporto statistico dell'affidabilità e attendibilità dell'albero filogenetico generato. Il programma produce una serie di dataset replicati, composti dallo stesso numero di sequenze dell'originale ma in cui le colonne sono una combinazione casuale con ripetizione di quelle iniziali. In questo modo è possibile valutare se l'albero reale generato rimane invariato anche

considerando solo parti delle sequenze in studio. I replicati sono sottoposti alle stesse analisi del dataset iniziale e i dati generati vengono valutati complessivamente dal programma CONSENSE, il quale crea infine un albero filogenetico che rappresenta il consenso di tutti i replicati. In quest'albero sono indicati dei valori, definiti di bootstrap, che rappresentano la frequenza con cui ogni diramazione è presente, esattamente nella stessa topologia, in tutti gli alberi replicati. Valori di bootstrap uguali o superiori al 70% sono considerati statisticamente significativi e convenzionalmente sono ritenuti indicativi di una relazione evolutiva attendibile; questo valore soglia è tuttavia arbitrario e può variare a seconda della complessità e numerosità delle sequenze in esame.

Le sequenze che all'analisi filogenetica non risultano tipizzabili vengono ulteriormente esaminate per cercare eventuali ricombinazioni tra ceppi noti. A tale scopo viene utilizzato il programma SimPlot (ver. 3.5.1), che si avvale del metodo per la ricerca delle ricombinazioni genomiche e permette di studiare sequenze con mosaicismi unici. Nell'analisi di ricombinazione sono state utilizzate unicamente le trentasei sequenze di riferimento dei sottotipi puri incluse nel dataset in studio, includendo le CRF soltanto per il confronto dei grafici di similarità.

Il programma può infatti generare due distinti grafici: il primo, detto 'similarity plot', è rappresentato da una serie di linee che riflettono l'omologia di ogni sequenza (o consensus di un gruppo di sequenze) di riferimento rispetto a quella da caratterizzare. Il secondo grafico è generato mediante la cosiddetta analisi di 'bootscan', che permette di visualizzare la percentuale di alberi permutati, sempre utilizzando parametri di scorrimento programmabili lungo l'intera sequenza. In questo modo viene analizzata l'intera sequenza nucleotidica in esame. I risultati sono presentati sotto forma di grafico a linee, che riportano i valori di omologia con i diversi sottotipi lungo tutta la sequenza. Sono necessari livelli di omologia superiori al 90% per individuare i sottotipi parentali coinvolti nel mosaicismo della sequenza. I punti di ricombinazione vengono individuati sia visivamente, osservando l'allineamento, sia ripetendo l'analisi di bootscan della sequenza studiata rispetto ad almeno tre sottotipi di riferimento, tra i quali vanno inseriti i ceppi che alla prima

analisi risultano coinvolti nella probabile ricombinazione.

CLONAGGIO

Ceppi batterici.

Escherichia coli XL1-blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lacF' [proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)] (Stratagene).

XL10 gold ultracompetent cells: TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr] (Stratagene).

Questi ceppi sono stati utilizzati come ospiti riceventi negli esperimenti di trasformazione (rispettivamente 'elettroporazione' ed 'heat shock').

Terreni e condizioni di crescita.

Per la crescita dei batteri è stato utilizzato il terreno di Luria-Bertani (LB): 10 g triptone, 5 g estratto di lievito e 10 g NaCl per litro di acqua bidistillata con l'aggiunta, nel caso di terreno solido, di agar 1.7%. Quando necessario, il terreno di coltura è stato addizionato con ampicillina 100 µg/ml.

Il terreno SOC (2% triptone, 0.5% estratto di lievito, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosio) è stato utilizzato per la crescita delle cellule di *E. coli* subito dopo l'elettrotrasformazione. I componenti dei terreni di coltura sono stati forniti dalla ditta OXOID (Milano, Italia).

Una volta preparati, i terreni sono stati sterilizzati in autoclave per 20 min. a 120°C alla pressione di 1 atm. I ceppi batterici sono stati cresciuti in termostato a 37°C in aerobiosi e, nel caso di brodocolture, con agitazione.

Plasmidi

Per il clonaggio dei prodotti di PCR è stato utilizzato il plasmide pGEM[®]-T Easy Vector (Promega, Madison Wi USA) (Fig.13).

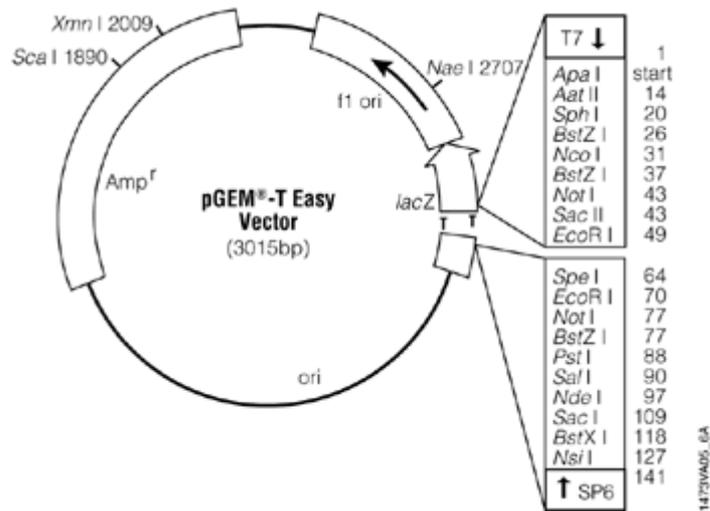


Fig .13 Mappa circolare del vettore pGEM[®]-T.

Il pGEM[®]-T è un vettore di clonaggio ad alto numero di copie (500-700 per cellula) grazie ad una particolare origine di replicazione opportunamente modificata. Il marker per la selezione di questo vettore è la resistenza all'ampicillina.

Nel sito di inserzione sono situate delle code sporgenti con timidina (3'-T) che consentono di migliorare notevolmente l'efficienza della ligazione di un prodotto di PCR nel plasmide, prevenendo la ricircolarizzazione del vettore e fornendo un'estremità compatibile per i prodotti di PCR generati dalla maggior parte delle polimerasi termostabili, le quali aggiungono una singola desossiadenosina, indipendentemente dal template, all'estremità 3' terminale del frammento amplificato.

Inoltre, pGEM[®]-T trasporta un gene *lacZ'* codificante per un α -peptide funzionale della β -galattosidasi: per questo, quando introdotto in un ceppo di *E. coli* mutante per *lacZ*, come XL1 che è *lacZ Δ M15*, fornisce per complementazione, un α -peptide funzionale e il ceppo riacquista l'attività β -galattosidasi. Il sito di clonaggio multiplo (MCS o polylinker) è inserito

all'interno del gene *lacZ'* senza, tuttavia, interromperne il frame: conseguentemente, il vettore come tale è in grado di restituire al ceppo che lo ospita (mutante per *lacZ*) l'attività galattosidasi, mentre il vettore chimerico (avendo un gene *lacZ'* interrotto da un inserto clonato), ha perduto questa capacità. Questa caratteristica del vettore permette perciò di distinguere, su piastre di terreno contenente un substrato cromogeno per la β -galattosidasi, i cloni ricombinanti che ospitano un "vettore con inserto", dai cloni ricombinanti che ospitano un vettore "vuoto" (vedi anche più avanti, al paragrafo "Elettroporazione e crescita dei trasformanti").

Il plasmide pNL4-3 presenta al 5' il frammento SmaI-EcoRI del provirus NY5 e al 3' il frammento del provirus LAV clonato nel pUC18 nel sito PvuII dopo rimozione del polylinker. Il marker per la selezione di questo vettore è la resistenza all'ampicillina.

Dopo la trasfezione questo clone produce particelle virali infettive in una grande varietà di cellule (Fig.14).

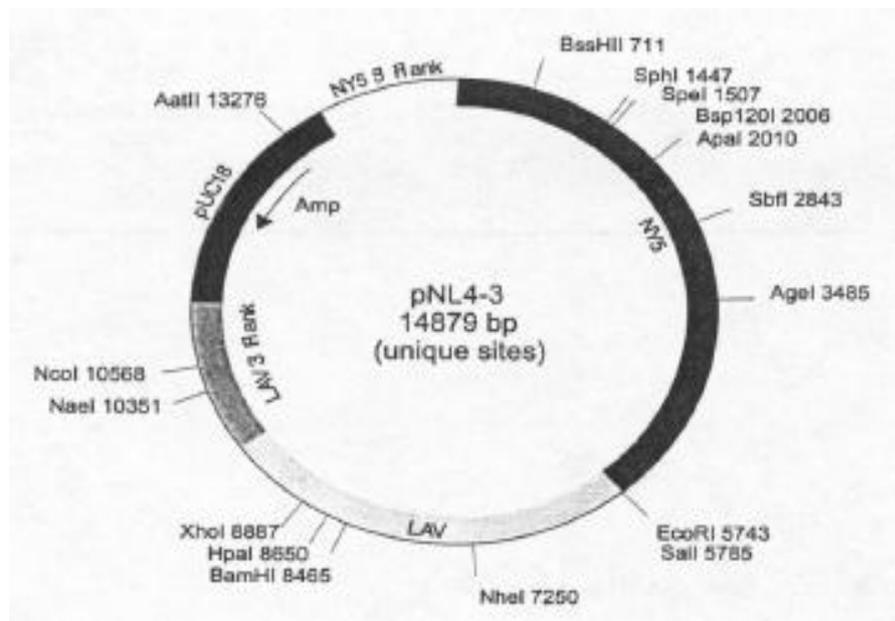


Fig .14 Mappa circolare del vettore pNL4-3

Il plasmide pBCSK (Stratagene) deriva dal fagemide pBluescriptII con il gene per la resistenza al Cloramfenicolo. Presenta un polylinker con 21 siti di restrizione unici a fianco del quale sono presenti i promotori per RNA polimerasi T7 e T3. Anche il pBCSK trasporta un gene lacZ' codificante per un α -peptide funzionale della β -galattosidasi (stessa caratteristica del pGEMT) (Fig.15).

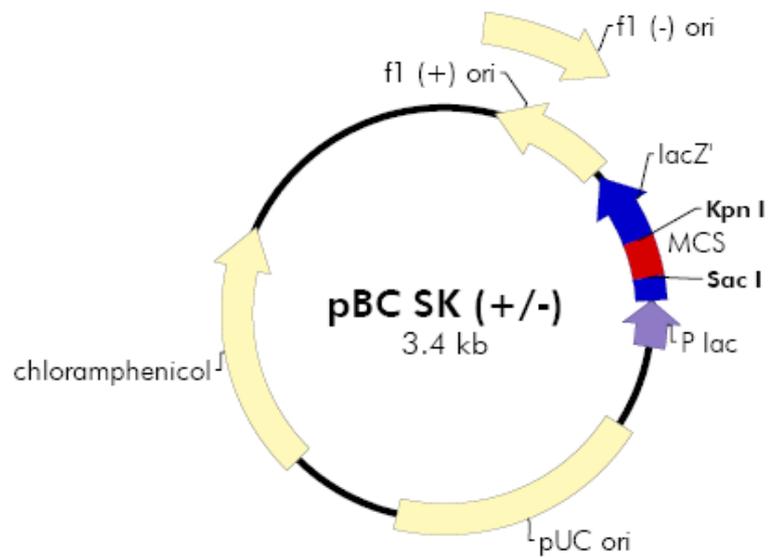


Fig .15 Mappa circolare del vettore pBCSK

Il plasmide PINCO presenta l'origine di replicazione di EBV, il gene EBNA-1 e una regione che codifica per la GFP (green fluorescence protein), sotto controllo del promotore del citomegalovirus. La trasfezione delle cellule 293FT comporta la propagazione episomale del plasmide, con produzione di GFP. La GFP è un monomero di 27 kD composto da 238 amminoacidi e che soltanto una piccola regione interna della proteina, detta cromoforo, è responsabile dell'emissione di fluorescenza. La proteina presenta il picco maggiore di eccitazione a 395 nm (luce ultravioletta) (Fig.16).

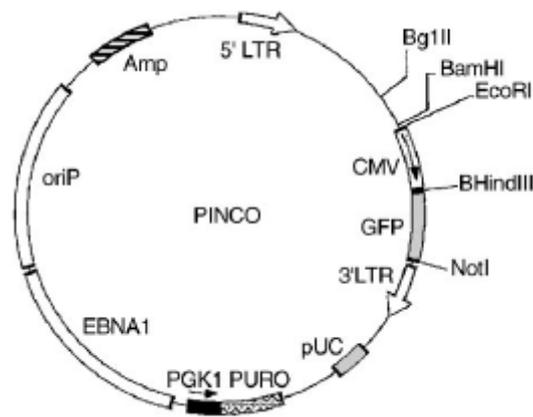


Fig. 16 Mappa circolare del vettore PINCO

Purificazione del prodotto di PCR e ligazione.

Per la purificazione dei prodotti di PCR è stato utilizzato il kit su colonna Wizard SV gel e PCR clean-up system (Promega). Nel caso della purificazione da gel, il frammento di agarosio contenente la banda di interesse viene tagliato ed il DNA viene eluito previa solubilizzazione dell'agarosio e legame degli acidi nucleici, in presenza di un tampone ad alta concentrazione salina, alla membrana di silice-gel di una colonna a scambio anionico. Le impurità, quali sali, agarosio, etidio bromuro, non

sono trattenute dalla membrana di silice e il DNA così purificato viene eluito con un tampone ad alta forza ionica.

Le quantità dei due frammenti nella reazione di ligazione venivano calcolate utilizzando la seguente formula:

$$\text{ng dell'inserto} = \text{ng del vettore} \times \frac{\text{lunghezza dell' inserto (bp)}}{\text{lunghezza del vettore (bp)}} \times \text{rapporto molare inserto : vettore}$$

Per la reazione di ligazione è stata utilizzata la T4 DNA ligasi e il 2x Rapid Ligation buffer (Promega).

Preparazione di cellule elettrocompetenti.

Le cellule sono state fatte crescere in terreno LB a 37°C in agitazione e la crescita è stata bloccata in fase esponenziale, al raggiungimento di O.D.₆₀₀ = 0,7. Successivamente, le cellule sono state lavate in volumi decrescenti di una soluzione di glicerolo al 10% in acqua bidistillata mantenuta a 4°C: con questo procedimento, vengono allontanati tutti i sali (e altre molecole) contenuti nel terreno di coltura e, contemporaneamente, le cellule sono concentrate di un fattore circa 500. Le cellule, rese in tal modo “elettrocompetenti”, possono essere aliquotate (aliquote di 50 µl) e conservate a -80°C, protette dal glicerolo presente in soluzione, oppure immediatamente utilizzate.

Elettroporazione

Per l'elettrotrasformazione, ad un'aliquota di cellule sono stati aggiunti 2 µl della miscela di ligazione. Il tutto viene trasferito in una cuvetta sterile per elettroporazione, dello spessore di 0,2 cm. Alla cuvetta è stato applicato, quindi, un campo elettrico di 2,5 mV (25 µFD/200 Ω) mediante un elettroporatore Gene Pulser Transfection Apparatus (Bio-Rad, Hercules, California, U.S.A.): il *pulse* è dell'ordine di 1 secondo.

Dopo questo shock elettrico, le cellule, risospese in 2,5 ml di terreno SOC, sono state incubate a 37°C in agitazione per 1-2 ore e, dopo questa fase

di stabilizzazione, aliquote della coltura (100-500 μ l) sono state piastrate su terreno selettivo contenente ampicillina 100 μ g/ml, il substrato cromogeno X-GAL (40 μ g/ml), e l'induttore IPTG (1mM). Come già detto, l'aggiunta di X-GAL alle piastre permette di distinguere facilmente le colonie che hanno acquisito un vettore ricombinante (colonie bianche) da quelle che invece contengono un vettore richiuso (colonie blu).

Trasformazione per heat shock

A un'aliquota di cellule viene aggiunto il β -mercaptoetanol e 2 μ l della miscela di ligation. La miscela viene lasciata in ghiaccio per 30 minuti e successivamente a 42°C per 30 secondi. Dopo questo shock termico, le cellule vengono risospese in 900 μ l di terreno SOC, e incubate a 37°C in agitazione per 1-2 ore. Dopo questa fase di stabilizzazione le aliquote della coltura (100-500 μ l) vengono piastrate su terreno selettivo contenente ampicillina 100 μ g/ml.

PCR di controllo ed estrazione del DNA plasmidico.

Dopo aver ripassato su piastra le colonie di interesse, viene effettuata una PCR di controllo con i primer interni all'inserto oppure sul plasmide (P287-P288) sulle colonie riprese con un puntale, in modo da assicurarsi che le cellule contengono in effetti il plasmide con l'inserto di interesse.

Una colonia rappresentativa per ogni campione viene ripresa ed inoculata in 5 ml di SOC overnight a 37°C in agitazione al fine di effettuare un'estrazione del DNA plasmidico. A tale scopo è stato utilizzato il kit Wizard Plus DNA Purification System SV Minipreps (Promega).

Mutagenesi sito specifica

La mutagenesi è stata eseguita nella regione *gag* e *vif* del plasmide pNL4-3. La sequenza degli oligonucleotidi è complementare allo stampo eccetto per i nucleotidi che definiscono la mutazione. L'oligonucleotide mutageno funziona come primer per la sintesi di DNA da parte della DNA polimerasi.

Una volta che l'intero stampo è stato copiato, le estremità del filamento di nuova sintesi vengono unite covalentemente grazie alla DNA ligasi. Con il DNA eteroduplice si trasforma *E.coli*. Il DNA plasmidico viene isolato dalle colonie risultanti e sequenziato per confermare la presenza delle mutazioni desiderate (Stratagene, QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kits).

Linee cellulari

293FT: sono cellule embrionali renali umane, a morfologia stellata che esprimono costitutivamente l'antigene T del virus vacuolante della scimmia (SV40), garantendo un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici, contenenti l'origine di replicazione di tale virus (Invitrogen). Le cellule 293FT vengono coltivate in terreno di crescita DMEM ("Dulbecco's modified Eagle's" medium, Gibco) addizionato con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS) (Gibco), e con gli antibiotici geneticina (500 µg/ml) (Sigma), streptomina e penicillina (100 µg/ml) (Gibco).

Tutte le colture cellulari vengono mantenute alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5% di CO₂.

MT4: sono cellule T linfoblastoidi CD4 positive e rappresentano un valido modello per gli studi di infezione *in vitro* con HIV-1; in coltura crescono in sospensione in terreno RPMI addizionato con il 10% di FBS, con gli antibiotici penicillina e streptomina e con glutammina (2 mM). I ceppi di HIV-1 di laboratorio T-tropici come NL4-3 inducono in questa linea cellulare un evidente effetto citopatico sinciziogeno.

Trasfezione

La trasfezione in cellule 293FT viene realizzata utilizzando complessi liposomici di lipidi cationici (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen). Il giorno precedente la trasfezione, le cellule vengono seminate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di 7.5×10^5 cellule per pozzetto, in terreno DMEM con 10% (v/v) di FBS, privo di antibiotici. Trascorse 24 ore, quando le

cellule risultano ad una confluenza del 60%-80%, si procede alla trasfezione con una miscela contenente 500 μ l di DMEM senza siero, 4.5 μ g di DNA, 8 μ l di soluzione di liposomi (secondo le indicazioni del produttore). Le cellule vengono incubate a 37°C per 24-48 ore e successivamente viene verificato il fenotipo di interesse. Negli esperimenti di ottimizzazione è stata utilizzata la fluorescenza delle cellule che esprimono la GFP contenuta nel plasmide PINCO, la quale è indice di avvenuta trasfezione.

Come secondo sistema di trasfezione è stato valutato anche il metodo della coprecipitazione con fosfato di calcio. Viene preparata una soluzione accuratamente tamponata contenente fosfato a cui è aggiunto DNA plasmidico. L'aggiunta di cloruro di calcio forma un fine precipitato di fosfato di calcio e DNA. Il precipitato è distribuito su un monostrato di cellule che crescono nelle piastre da 6 pozzetti e lasciato sulle cellule per diverse ore, durante le quali molte di esse captano il DNA. Il precipitato viene poi rimosso dalle cellule che vengono successivamente incubate in un terreno di coltura fresco per 24 ore. Anche in questo caso viene verificata la fluorescenza delle cellule che esprimono la GFP al microscopio a fluorescenza.

Risultati

Prevalenza e andamento temporale dei sottotipi non-B

Al momento in cui sono state effettuate le analisi presentate in questa tesi la banca dati delle sequenze del gene *pol* di HIV-1 del Servizio di Monitoraggio HIV gestito presso il Dipartimento di Biologia Molecolare dell'Università di Siena includeva 8282 sequenze di PR e 8667 sequenze di RT, ottenute dal 1992 al 2006 su 3698 pazienti distinti.

Per la valutazione della distribuzione dei sottotipi e CRF sono state considerate solo le sequenze complete (PR+RT) analizzate dal 1996 al 2006 (n = 7665). Per ogni paziente è stata valutata la prima sequenza ottenuta. Nei 3485 pazienti esaminati, 362 (10.4%) sequenze sono risultate di sottotipo diverso dal B, storicamente prevalente in Italia e nei paesi occidentali in genere. La Fig.17 riporta la distribuzione dei sottotipi non-B nell'intera casistica disponibile mostrando la notevole eterogeneità delle varianti repertate, con una netta prevalenza dei sottotipi A1, C, G ed F1 e delle CRF 01_AE e 02_AG, unici raggruppamenti la cui rappresentatività supera il 5% del totale dei non-B.

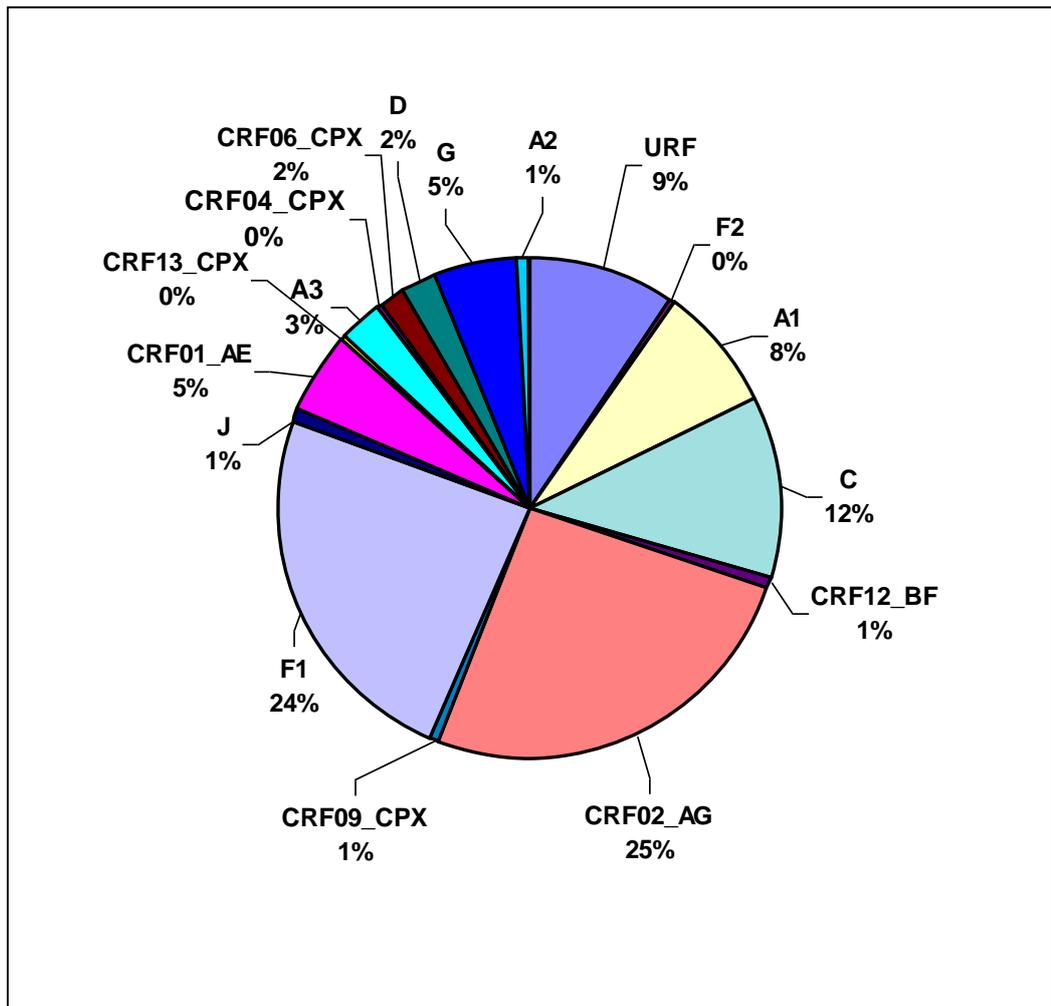


Fig.17 Distribuzione percentuale all'interno dei sottotipi non-B (n = 362) ottenuti dalla casistica totale dei 3485 pazienti esaminati.

Da notare che il 9.4% (n = 34) dei casi è però costituito da (URF), tutte distinte fra loro, per le quali non si è evidenziato un grado di omologia filogenetica sufficiente ad assegnare la sequenza ad alcuno dei sottotipi e CRF note.

La prevalenza dei sottotipi non-B nel corso del tempo, stimata considerando per ogni paziente la data della prima genotipizzazione eseguita, mostra un chiaro aumento nel corso degli ultimi 10 anni (Fig.18), con un aumento di circa quattro volte dal 2000 al 2006, giungendo al 29.6% nel 2006 (P < 0.0001, test del chi-quadro).

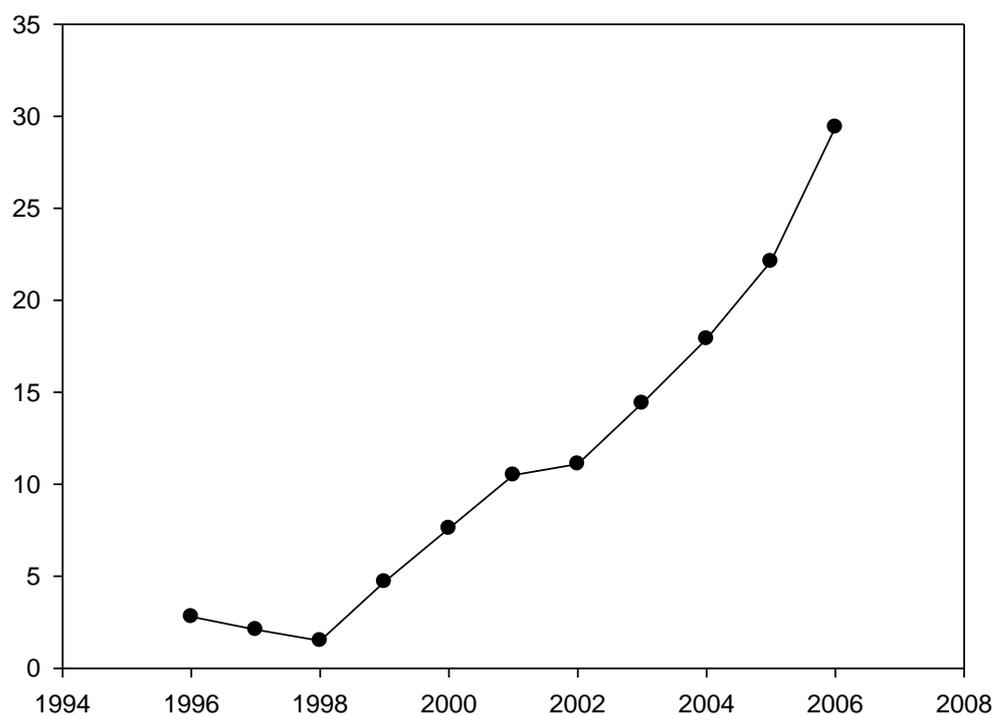


Fig.18 Percentuale dei sottotipi non-B ($n = 362$) nella casistica totale dei 3485 pazienti esaminati nel corso del periodo 1996-2006.

Fattori demografici correlati ai vari sottotipi

Fra i fattori demografici possibilmente correlati ad infezione con i vari sottotipi è stata valutata la provenienza geografica come distinzione fra cittadini Italiani e non, limitatamente alle informazioni disponibili nella banca dati del Servizio. In particolare, la nazionalità per i pazienti con infezione non-B era nota per l'82.8% dei casi. A fronte della quasi totalità di nazionalità italiana in presenza di HIV-1 di sottotipo B, si è registrato un 54.6% di provenienza estera per il gruppo cumulativo delle infezioni non-B ($P < 0.0001$, chi-quadro test) (Fig. 19). La disponibilità di un numero sufficiente di casi di specifici sottotipi non-B ha consentito di evidenziare differenze a carico di sottotipi C, CRF01_AE e F1, per i quali la percentuale di nazionalità italiana rimane relativamente elevata (56-75%) nei confronti della CRF02_AG, nella quale la rappresentanza estera (in questo caso sempre africana) è decisamente preponderante (89%) ($P <$

0.001 per tutti gli altri confronti fra G e ciascuno dei sottotipi del secondo raggruppamento).

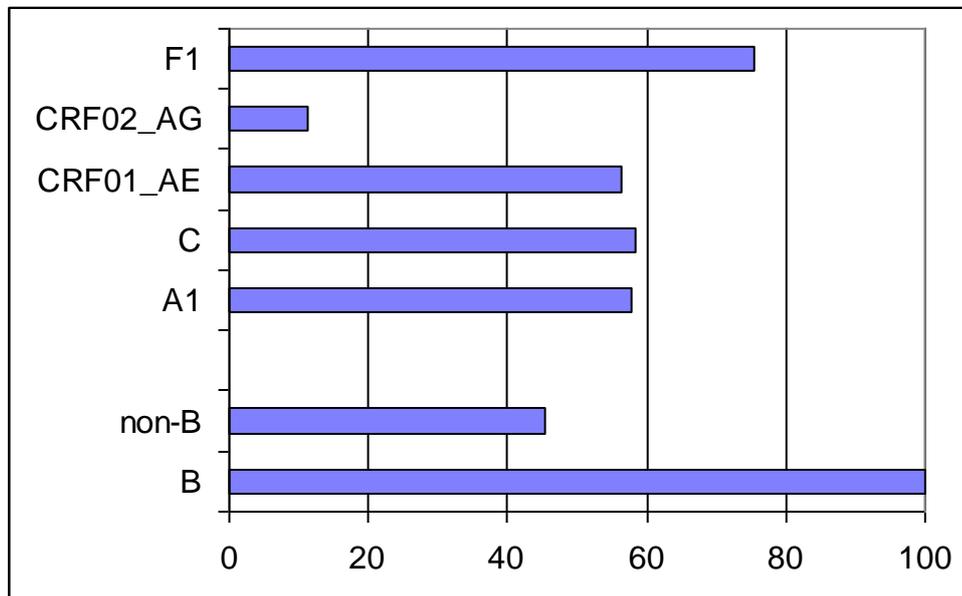


Fig. 19 Percentuale dei pazienti di nazionalità italiana con infezione sostenuta da specifici sottotipi e relativamente ai raggruppamenti cumulativi B e non-B.

Anche l'analisi della ripartizione dei vari sottotipi in base al sesso ha evidenziato differenze notevoli (Fig. 20). I pazienti di sesso maschile sono infatti risultati il 72.1% in caso di infezione da HIV-1 B ma solo il 55.3% in presenza di sottotipi non-B ($P < 0.0001$, chi-quadro test). Anche per questo parametro è stato inoltre possibile individuare situazioni divergenti nell'ambito di specifici sottotipi: lo spostamento di prevalenza dell'infezione verso il sesso femminile globalmente riscontrato per i ceppi non-B deriva infatti in modo determinante dai sottotipi A1, C, e CRF02_AG (quasi sempre individuati in pazienti africani), poiché i ceppi F1 e CRF01_AE (rispettivamente caratteristici di Sud-America/Est europeo e Sud-Est asiatico) sono prevalentemente associati ai pazienti di sesso maschile in modo simile al sottotipo B ($P = 0.1$ per il confronto fra A1 e F1 o CRF01_AE; $P < 0.05$ per quelli fra C e F1 o CRF01_AE; $P < 0.0001$ per quelli fra CRF02_AG e F1 o CRF01_AE).

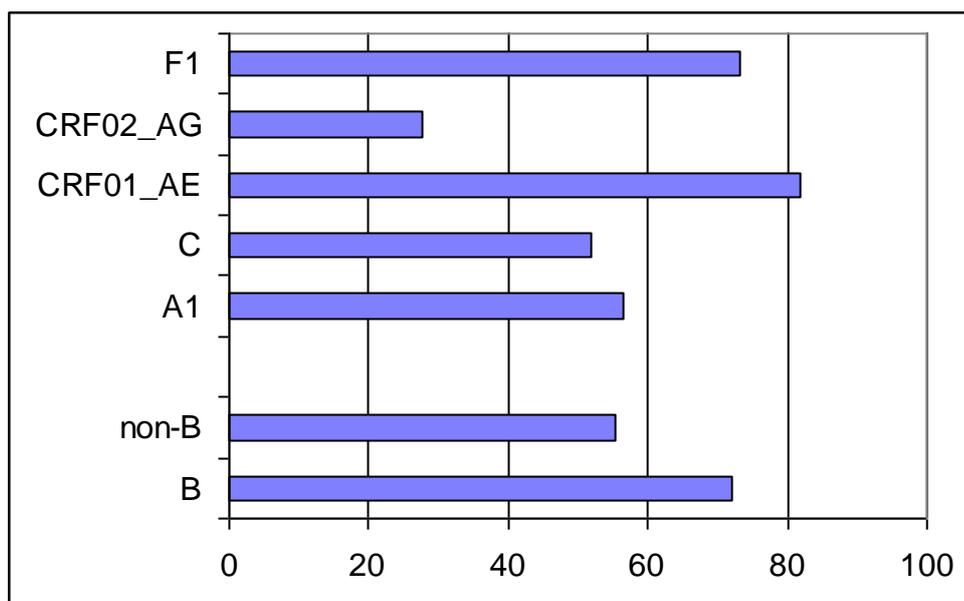


Fig. 20 Percentuale di pazienti maschi con infezione sostenuta da specifici sottotipi e relativamente ai raggruppamenti cumulativi B e non-B.

Sequenziamento full-length del campione n. 60.000

L'analisi filogenetica del gene *pol* ottenuto dal campione n. 60000 nell'ambito della normale attività assistenziale di genotipizzazione (codice paziente 4365) ha suggerito che la sequenza in esame, di sottotipo A1, potesse rappresentare un isolato di particolare interesse. Infatti l'albero derivante mostra che tale sequenza si pone in associazione con una particolare tipologia di sequenze A1 descritte in pazienti provenienti dalla ex Unione Sovietica, come confermato dai valori di bootstrap (Fig. 21).

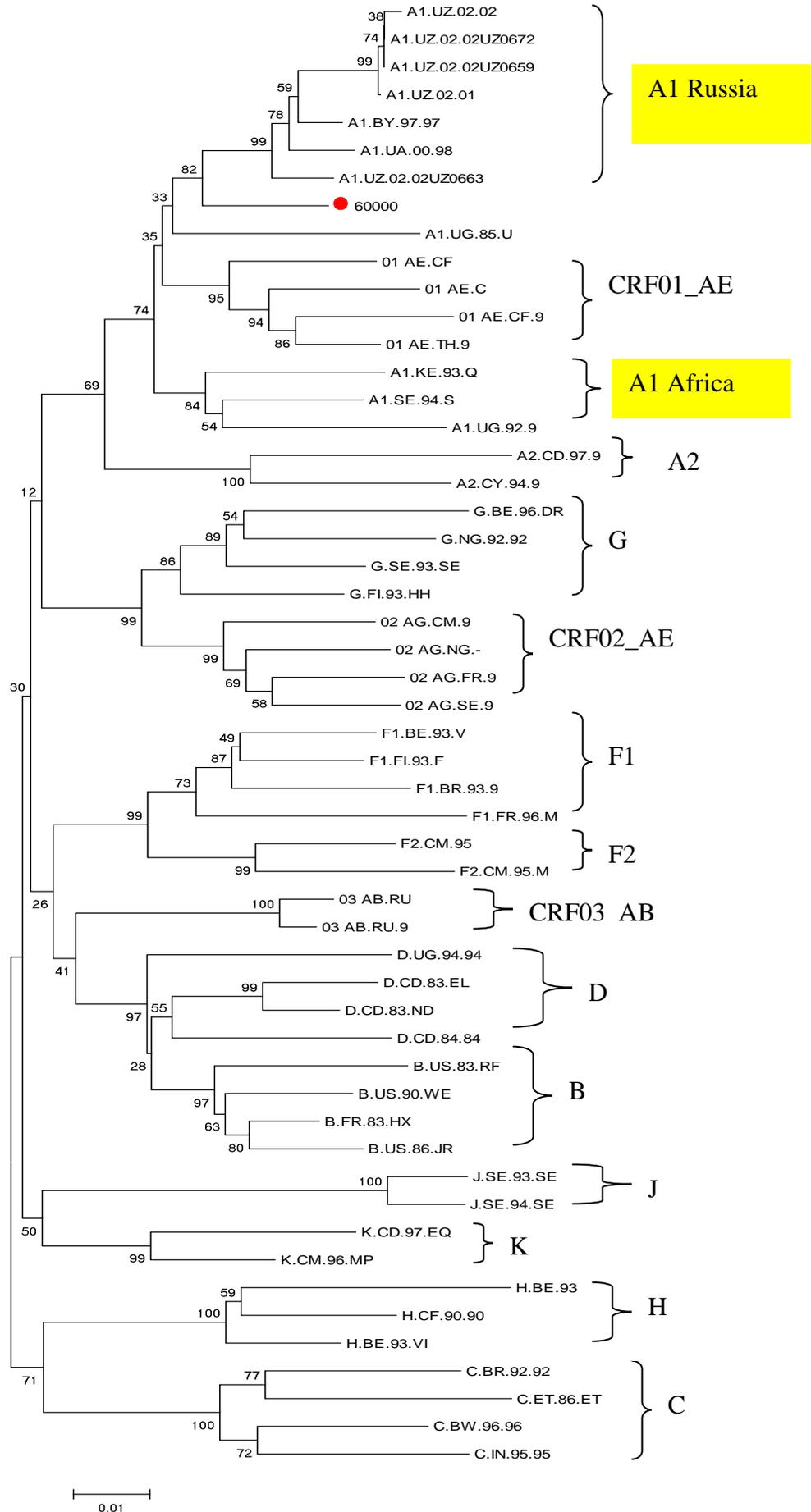


Fig. 21 Albero filogenetico sul gene *pol* con valori di bootstrap

Il paziente 4365 è risultato tuttavia originario della Guinea con capitale Conakry, residente a Perugia e individuato come HIV-infetto non appena ivi trasferito. Dall'anamnesi è emerso come fattore di rischio essere stato sottoposto a due trasfusioni di sangue nel proprio paese nel 1987. Il paziente, prima di arrivare in Italia, non aveva mai lasciato il proprio paese e non aveva mai avuto contatti con persone provenienti dall'Europa dell'Est. Tutto ciò configurava l'ipotesi che la sequenza *pol* individuata potesse rappresentare un collegamento filogenetico, fino ad allora non individuato, fra i ceppi A1 tipici dell'Africa equatoriale e i ceppi A1 protagonisti di una parte dell'epidemia nei paesi dell'ex blocco sovietico. Dopo una serie di valutazioni sperimentali preliminari utilizzando vari enzimi e condizioni di reazione, il sequenziamento delle altre regioni del campione 60000 è stato ottenuto a partire da una triplice nested PCR in cui i primer della prima reazione si allineavano in corrispondenza delle estremità del genoma mentre nelle altre due reazioni sono stati utilizzati primer interni fino ad ottenere un prodotto di 8674 bp. La parte terminale delle LTR è stata infine ottenuta separatamente (Tab. 3 e Fig. 22)

Tabella 3. Combinazioni dei primer di PCR e di sequenza utilizzati per il sequenziamento full-length del campione n. 60000.

| N° reazione | Primer interni di amplificazione | Primer per sequenziamento | Coordinate su HBX2 della regione sequenziata |
|-------------|---|----------------------------|--|
| 1 | P192 – P111 | IR54 – IR59 IR71 – IR72 | 3265 – 4226 |
| 2 | P110 – P159 | IR55/ IR73 – 74 | 4165 – 4821 |
| 3 | P158 – P185 | IR57 | 4987 – 5647 |
| 4 | P79 – P216 | IR54 – IR55 | 4137 – 4305 |
| 5 | P217 – P213 | IR69 – IR70 | 1693 – 2547 |
| 6 | P203 – P151 | IR60 – IR77 | 6901 – 7521 |
| 7 | P221 – P82 | IR82 – IR68 | 137 – 1378 |
| 8 | P226 – P227 P224 – P225 P226 – P225 | IR75 – IR76 | 5632 – 6936 |
| 9 | P228 – P230 P228 – P229 P154 – P230 | IR78 – IR79 | 8033 – 8968 |
| 10 | P158 – P166 P158 – P167 | IR73 – IR74 | 4794 – 5049 |

| | | | |
|----|-------------|-------------|-------------|
| 11 | NEF3 – NEF4 | IR85 | 8836 - 9450 |
| 12 | P139 – P140 | IR33 – IR34 | 1025 - 1716 |
| 13 | LR35 – P155 | IR25 – IR46 | 7131 – 8150 |

Nelle figure 23 e 24 sono mostrati gli alberi filogenetici relativi rispettivamente all'allineamento delle sequenze full-length e all'allineamento della regione del gene *env*

fra il campione n. 60000 (contrassegnato in rosso) e alcune sequenze di riferimento di ciascun sottotipo puro e CRFs.

Fig. 23 Albero filogenetico delle sequenze full lenght. Sono indicati i valori di bootstrap

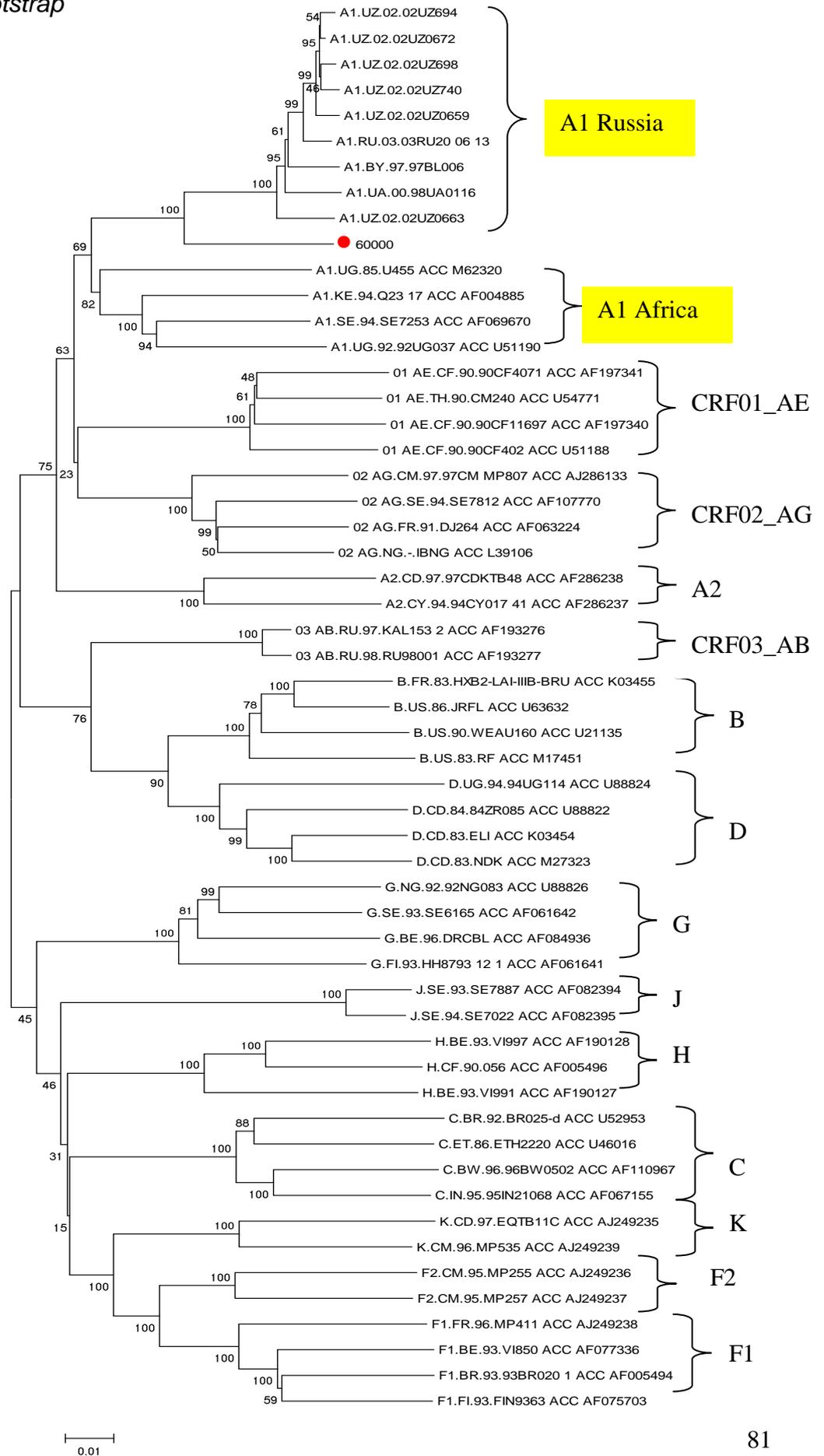
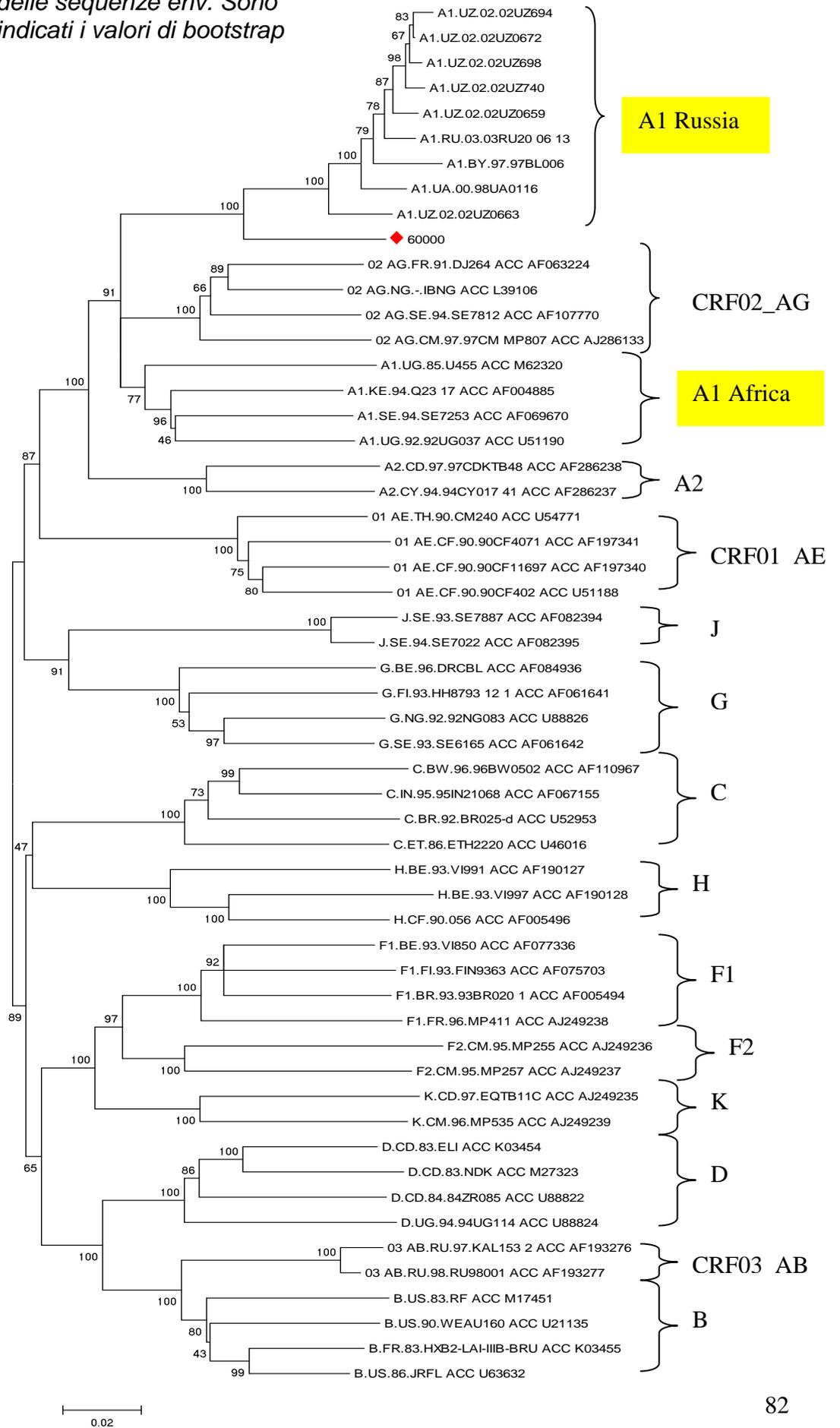


Fig. 24 Albero filogenetico delle sequenze env. Sono indicati i valori di bootstrap



Studio comparativo delle mutazioni di farmacoresistenza riscontrate nel DNA e RNA di medesimi pazienti.

Al fine di verificare se l'analisi del DNA provirale possa consentire un aumento di sensibilità rispetto a quella dell'RNA plasmatico nell'individuazione di mutazioni di resistenza nella popolazione virale in pazienti mai trattati con antiretrovirali ('naive'), è stata effettuata una valutazione comparativa di sequenza fra la popolazione virale circolante nel plasma e quella archiviata nei PBMC in 212 pazienti 'naive' (Vicenti *et al.*, in stampa). Per questi soggetti era, infatti, disponibile un campione di plasma e di PBMC derivati da uno stesso prelievo di sangue ottenuto prima dell'inizio della terapia. Per 17 dei soggetti esaminati si disponeva di informazioni indicative di infezione acuta (sierconversione e/o sindrome da infezione primaria susseguente a recente sierologia negativa).

Mutazioni di farmacoresistenza nel DNA e/o RNA sono state individuate nella popolazione virale di 35 (16%) pazienti. In 26 (12%) di questi casi sono state individuate mutazioni di resistenza sia nel DNA provirale sia nell'RNA virionico plasmatico; in 3 (1%) e 11 (3%) pazienti sono state invece rilevate mutazioni di resistenza solo nell'RNA e solo nel DNA, rispettivamente (Fig. 25).

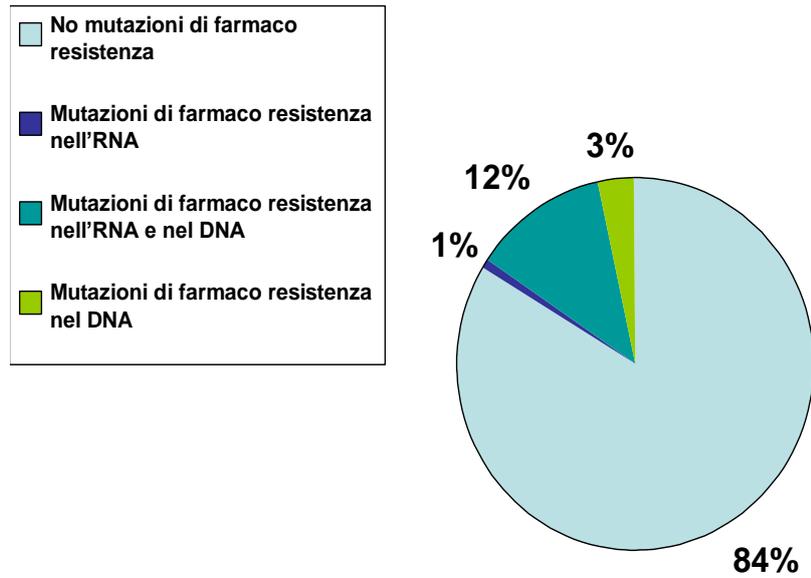


Fig. 25 Distribuzione percentuale dei campioni ottenuti da pazienti 'naive' in base all'evidenza di mutazioni di farmacoresistenza.

In 14 (40%) dei 35 pazienti con evidenza di resistenza il quadro mutazionale individuato implicava una significativa riduzione di suscettibilità a più classi di farmaci; negli altri 21 (60%) pazienti sono state messe in evidenza mutazioni di resistenza a carico di una sola categoria di farmaci (Fig. 26).

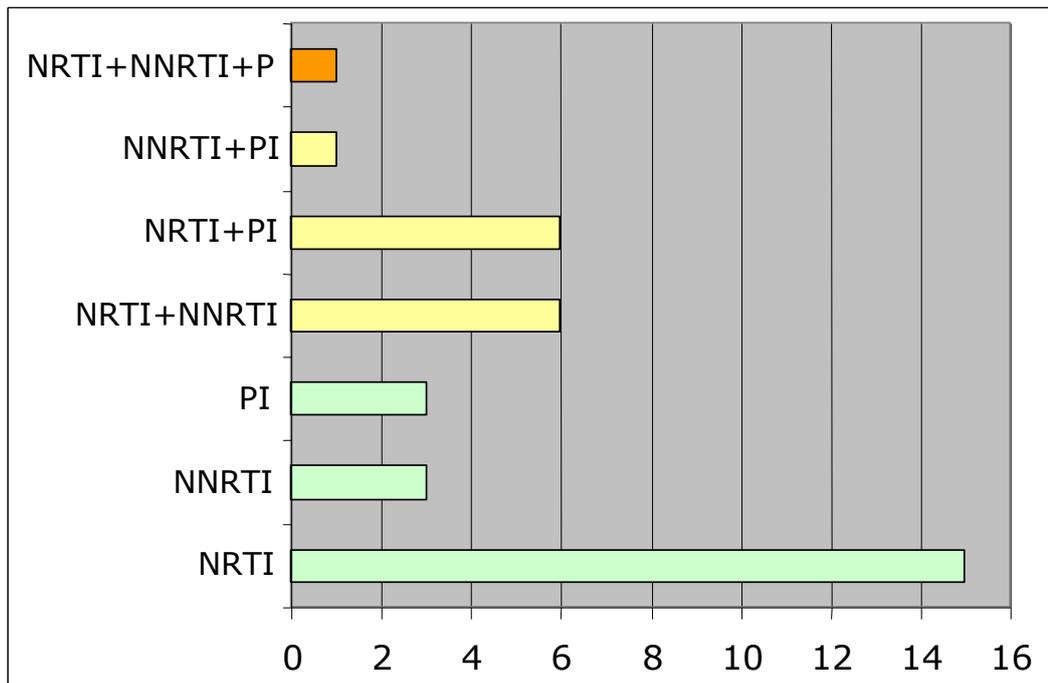


Fig. 26 Distribuzione percentuale della resistenza alle varie classi di antiretrovirali in 212 pazienti 'naive'.

Nella popolazione virale di 11 (31%) dei 35 pazienti analizzati è stato dimostrato un numero di mutazioni di resistenza a livello del DNA nei PBMC superiore rispetto di quello a livello dell'RNA plasmatico (Tab. 5). Il fenomeno interessa sia la RT sia la PR, coinvolgendo mutazioni di resistenza nei confronti di tutte le classi di farmaci.

| RT RNA | RT DNA | PR RNA | PR DNA |
|-----------------------|--------------------------------|----------------|---|
| 70R | 70R 184I | Nessuna | Nessuna |
| Nessuna | 70R | Nessuna | Nessuna |
| 215S | 41L 215Y | Nessuna | Nessuna |
| Nessuna | 108I | Nessuna | Nessuna |
| 103N | 103N | 60E | 36I 46I 60E 73S |
| Nessuna | Nessuna | 20M 36I 93L | 20M 30N 36I 46I 93L |
| Nessuna | 190E | 36I | 36I |
| 41L 118I 210W 215D | 41L 67N 118I 184V 210W 215Y | 60E | 10I 20I 36I 46I 54V 74S 77I |
| Nessuna | 41L 67N 118I 184V 210W 215Y | 36I 63P | 10I 20IM 36I 46I 54V 63P 74S 77I 82F |
| Nessuna | 41L 67N 118I 184V 210W 215Y | 36I 63Q | 10I 20I 36I 46I 54V 63Q 74S 77I 82F |
| Nessuna | 184V 215S | 36L 63P | 10I 36IL 46I 54V 63P 74S 77I 82F |

Tabella 5. Pattern mutazionale negli 11 pazienti con numero più elevato di mutazioni a carico della popolazione virale derivata da DNA di PBMC

L'evidente somiglianza dei pattern mutazionali in alcuni di tali ceppi resistenti è stata suffragata dall'analisi filogenetica la quale ha permesso di evidenziare un gruppo di sequenze altamente correlate, compatibili con un cluster epidemiologico (ultimi quattro casi in Tab. 5; pazienti 164, 165, 166, 168 in Fig. 27).

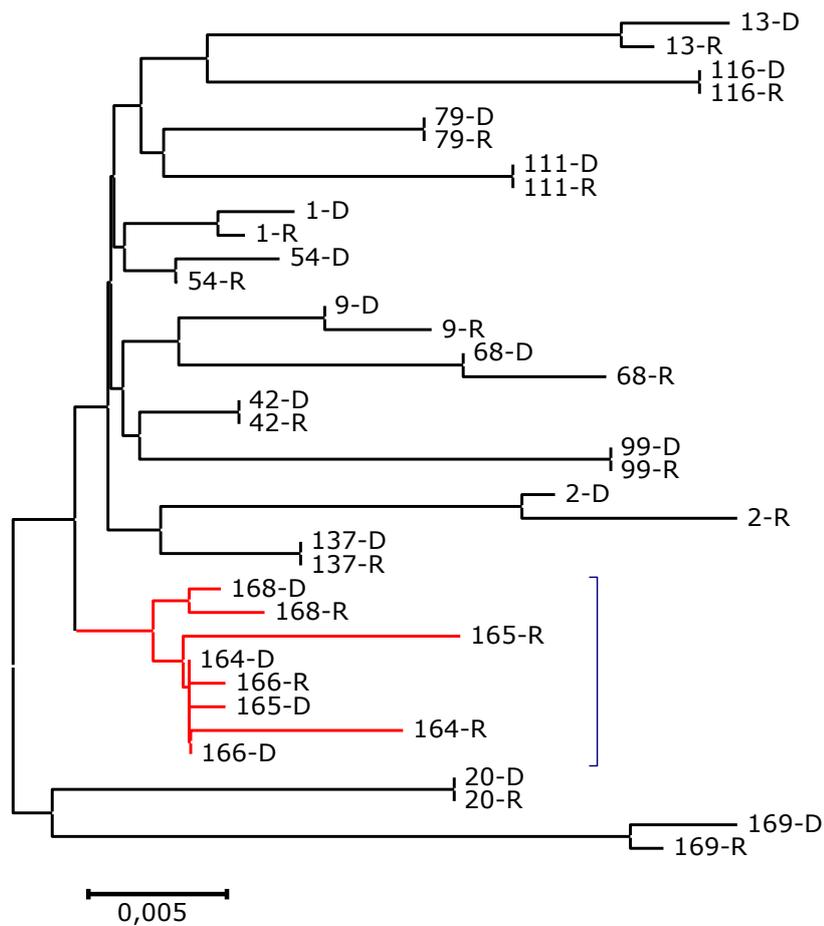


Fig. 27 Rapporto filogenetico fra alcune delle sequenze esaminate. Si evidenzia un possibile cluster epidemiologico (in rosso). I numeri indicano i pazienti, "D" ed "R", denotano la sequenza ottenuta da DNA e da RNA, rispettivamente.

Diversamente da quanto rilevato negli 11 casi di cui sopra, in 3 (9%) pazienti la popolazione virale plasmatica ha mostrato un maggior numero di mutazioni rispetto a quella cellulare (Tab. 6). Globalmente si è quindi osservata una maggiore probabilità di evidenziare mutazioni di resistenza nel DNA cellulare piuttosto che nell'RNA plasmatico ($P = 0.01$).

| RT RNA | RT DNA | PR RNA | PR DNA |
|---------------------------|----------------------|---------|---------|
| 67N 69N 181C 184V 219Q | 67N 69N 181C 219Q | 36I 63P | 36I 63P |
| 41L 215C | None | 63P | None |
| None | None | 36I 46I | None |

Tabella 6 Pattern mutazionale nei 3 pazienti con numero più elevato di mutazioni a carico della popolazione virale derivata da RNA da plasma.

Una maggiore variabilità nella popolazione archiviata nei PBMC rispetto a quella circolante nel plasma sembra del resto essere avvalorata in senso generale dal maggior numero medio di mutazioni in toto (di resistenza e non: media 42.7 vs. 39.9, $P < 0.001$) nonché di misture (basi degenerate nel cromatogramma derivato dalla reazione di sequenziamento: media 29.5 vs. 26.9, $P < 0.001$). L'analisi comparativa della distanza fra le sequenze di DNA e RNA per il gruppo dei pazienti con infezione acuta ($n = 17$) vs. i pazienti con infezione cronica ($n = 195$) non ha invece rilevato differenze significative. Allo stesso modo anche il numero di basi degenerate non è risultato diverso fra i due gruppi.

Infine l'analisi dei valori disponibili di viremia e di numero di linfociti CD4 circolanti corrispondenti al campione da cui sono state ottenute le coppie di sequenze ha permesso di individuare una relazione inversa fra livello di tali cellule e distanza genetica fra DNA e RNA virale mentre la quantità di HIV RNA plasmatico non ha mostrato correlazione con questa (Fig. 28).

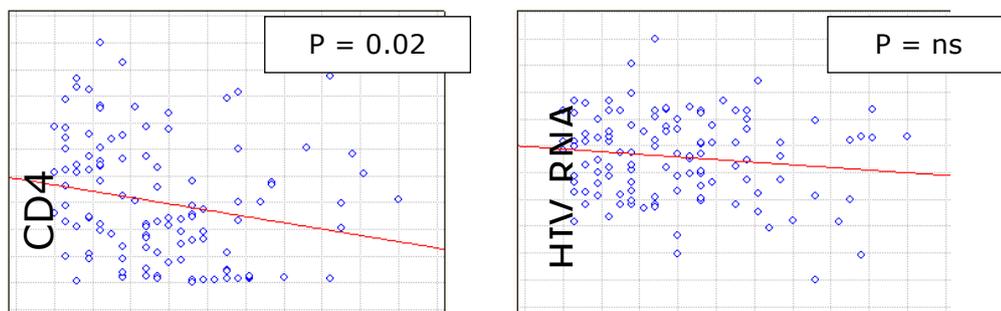


Fig.28 Correlazione del livello di linfociti CD4 nel sangue e di HIV RNA con la distanza genetica fra DNA ed RNA virale.

Valutazione della resistenza naturale all'enfuvirtide (T20)

L'allestimento del saggio per il rilevamento delle mutazioni di resistenza all'unico inibitore di fusione ad oggi disponibile (T20 o enfuvirtide) ha beneficiato dell'esperienza di sviluppo di un sistema analogo per il sequenziamento della regione *pol* sede delle mutazioni di resistenza per NRTI, NNRTI e PI (Vicenti, 2003). In particolare sono state favorevolmente utilizzate tutte le informazioni di ottimizzazione già risultate critiche (es. quantità di primer) per minimizzare la produzione di frammenti di PCR aspecifici pur dovendo ottenere materiale sequenziabile a partire da livelli minimi di HIV1 RNA, esigenza richiesta per l'applicazione clinica. Alla luce della possibilità di ottenere buone rese di amplificazione con regioni di oltre 1000 basi, è stato scelto di includere nel bersaglio anche la parte a monte della regione 36-45 della gp41, comprendendo abbondantemente il dominio V3 della gp120. Questa informazione di sequenza aggiuntiva è considerata di potenziale utilità non solo poiché il V3 rappresenta da sempre una regione essenziale per lo studio della variabilità virale ma anche perché costituisce la sequenza codificante per il dominio deputato all'interazione con i corecettori CCR5 e CXCR4. In considerazione delle possibili variazioni di sensibilità al T20 in ceppi a diverso tropismo corecettoriale (Derdeyn 2000) e della prossima disponibilità di farmaci antagonisti dei corecettori (Wilkin *et al.*, 2007), l'informazione su un'eventuale variazione di sequenza V3 in corso di trattamento può essere di interesse, considerata anche la disponibilità di tools bioinformatici attraverso i quali è possibile predire il tropismo corecettoriale di HIV sulla base della sequenza V3 (<http://coreceptor.bioinf.mpi-sb.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl>) (Sander *et al.*, 2007).

Nonostante il livello di variabilità del gene *env*, i primer di amplificazione e di sequenziamento selezionati hanno fornito prestazioni eccellenti nella caratterizzazione di 166 sottotipi risultati non-B sulla base della regione *pol* precedentemente sequenziata. Nel pool di tali sottotipi, tutti sequenziati con successo, erano compresi soprattutto ceppi A1, C, F1,

CRF01_AE, CRF02_AG, CRF03_AB. L'inclusione di un'estesa regione della gp120 ha comportato tuttavia in circa il 15% dei casi il riscontro di popolazioni virali miste alcune delle quali contenenti piccole inserzioni e/o delezioni che hanno reso impraticabile il sequenziamento di popolazione (scelta tipica nell'impiego clinico). Per tale motivo e per la possibilità che anche regioni verso il C-terminale della gp41 possano avere qualche ruolo nella modulazione della resistenza al T20, la successiva sperimentazione è stata eseguita considerando una regione di 1351 basi spostata più a valle rispetto al sistema precedente utilizzato. Alla luce di una possibile espansione dell'uso del T20 nella pratica clinica, è stata valutata la variabilità naturale della gp41 in 228 pazienti T-20 naive nell'intento di individuare se e con quale frequenza possano essere presenti mutazioni coinvolte nella resistenza ad enfuvirtide (Razzolini *et al.*, 2007).

I campioni sono stati scelti fra quelli pervenuti al Servizio di Virologia dell'Azienda Ospedaliera Senese, già analizzati su HIV-1 *pol* e rappresentativi della diversificazione dei vari sottotipi e CFRs. Per 194 (85,8%) pazienti si è avuta una designazione concordante di sottotipo in base all'analisi delle due regioni distinte *pol* ed *env*. Le discordanze ottenute erano in buona parte dovute ad assegnazione di una regione a CRF compatibili con il sottotipo derivato dall'altra regione (es. *pol* di sottotipo A1 ed *env* designato come CRF22_01A1) (Tab. 7).

| <i>Sottotipi pol</i> | <i>Sottotipi env</i> | <i>No.di casi (%)</i> |
|----------------------|----------------------|-----------------------|
| B | B | 96 (42.5) |
| CRF02_AG | CRF02_AG | 31 (13.7) |
| F1 | F1 | 21 (9.3) |
| C | C | 13 (5.8) |
| CRF01_AE | CRF01_AE | 9 (4.0) |
| A1 | A1 | 6 (2.7) |
| F1 | B | 4 (1.8) |
| A3 | A3 | 3 (1.3) |
| G | G | 3 (1.3) |
| A2 | A2 | 2 (0.9) |
| A1 | CRF22_01A1 | 1 (0.4) |
| CRF06_CPX | CRF06_CPX | 1 (0.4) |
| D | D | 1 (0.4) |
| J | J | 1 (0.4) |
| F1 | URF | 11 (4.9) |
| URF | URF | 7 (3.1) |
| A1 | URF | 4 (1.8) |
| CRF02_AG | URF | 4 (1.8) |
| A3 | URF | 3 (1.3) |
| B | URF | 1 (0.4) |
| CRF06_CPX | URF | 1 (0.4) |
| URF | C | 1 (0.4) |
| URF | CRF09_CPX | 1 (0.4) |
| URF | CRF18_CPX | 1 (0.4) |

Tabella 7 Designazione di sottotipo sulla base dell'analisi filogenetica condotta su pol ed env

L'allineamento delle sequenze aminoacidiche 1-200 della regione gp41 nei sottotipi più rappresentati (B, C, F1 e CRF02_AG) ha evidenziato alcune variazioni del livello di conservazione sottotipo-specifiche (Fig. 29).

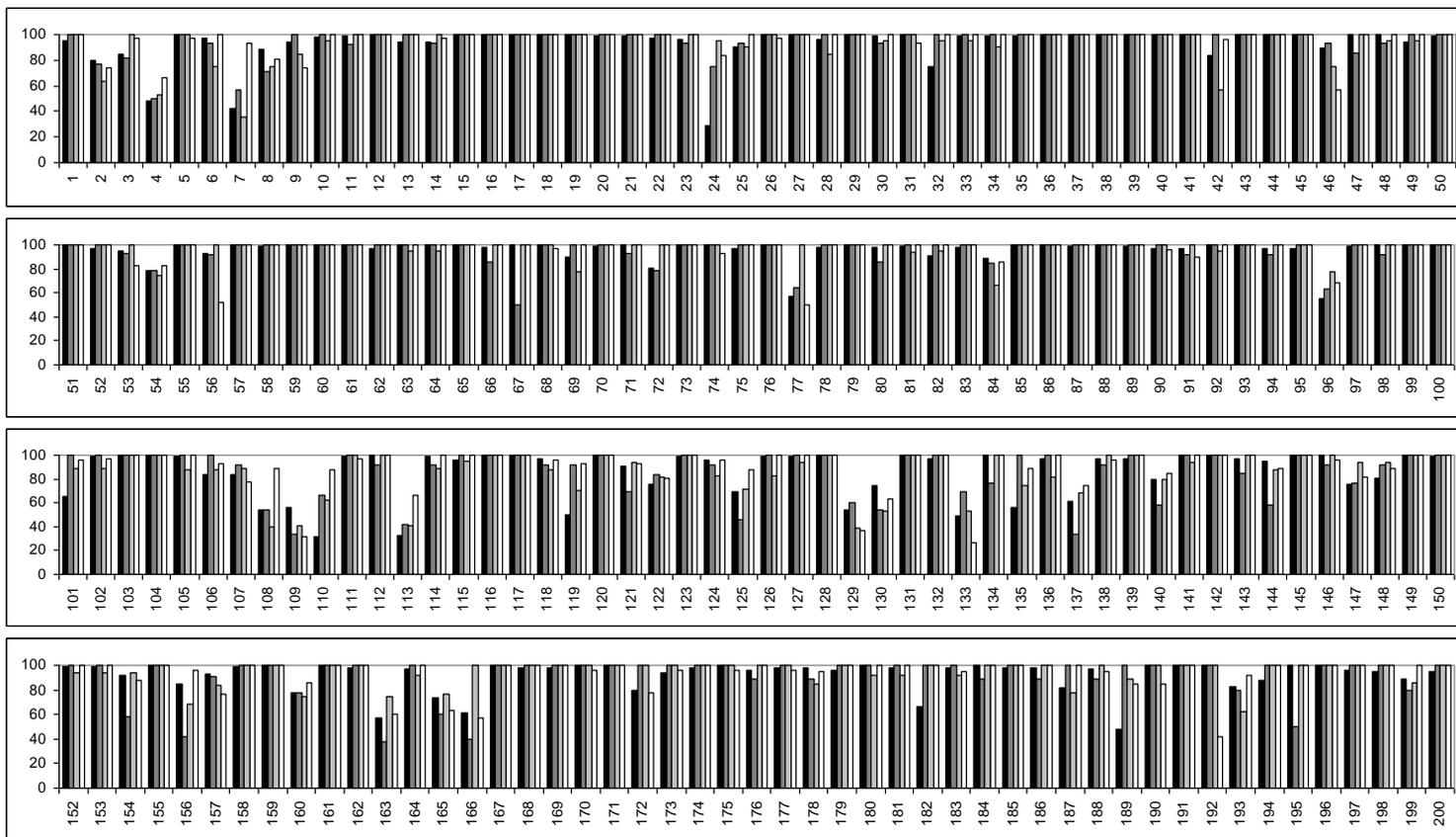


Fig. 29 Percentuale del livello di conservazione aminoacidica in env nei sottotipi B (colonne nere), C (colonne grigio scuro), F1 (colonne grigio chiaro) e CRF02_AG (colonne bianche)

Nessuna delle sequenze *env* presentava mutazioni di farmacoresistenza al T20. Sono stati evidenziati in una minoranza di casi polimorfismi in posizioni 39, 40 e 43 per i quali può essere attesa un'attività di modulazione della resistenza al T20 in presenza delle tipiche mutazioni di resistenza nella regione 36-45. Il codone 42 presenta uno spiccato polimorfismo (ma non la variante resistente 42T) strettamente sottotipo-dipendente (la variante 42S è il consensus nei ceppi A e C).

Valutazione dell'insorgenza della resistenza all'enfuvirtide (T20)

Durante la mia permanenza nel laboratorio ospitante è stato condotto uno studio collaborativo con la Clinica di Malattie Infettive dell'Ospedale Sacco di Milano inteso alla valutazione dell'evoluzione del genotipo *env* sotto pressione selettiva con T20.

La casistica in questione comprendeva 12 pazienti, con funzione immunologica molto ridotta e pesantemente pretrattati con molti regimi terapeutici, sui quali è stato avviato un nuovo trattamento combinato includente T20 presso la Seconda Divisione di Malattie Infettive dell'Ospedale Sacco di Milano. La Tab. 8 mostra le caratteristiche di baseline di tali pazienti per quanto riguarda la carica virale e il genotipo virale PR e RT (lista delle mutazioni di resistenza nei confronti degli inibitori di PR e di RT), nonché il tipo di terapia attuato con inclusione di T20.

| Paziente | Carica virale (log HIV RNA/ml) | Mutazioni PR | Mutazioni RT | Nuova terapia |
|----------|--------------------------------------|--|--|----------------------|
| 1 | 4,85 | 36I 63P | Wild type | 3TC D4T ATV T20 |
| 2 | 5,7 | 10I 20R 36I 54V 82F 90M | 67N 70E 215F | DDI D4T LPV/R T20 |
| 3 | 4,81 | 10I 20R 46L 63P 71V 73S 82A 90M | 41L 44D 67N 118I 184V 210W 215Y | 3TC DDI FPV/R T20 |
| 4 | 5,7 | 10V 48V 54V 82A | 41L 118I 210W 215Y | 3TC TPV/R T20 |
| 5 | 4,63 | 10IV 46L 53L 54V 63P 71V 73S 82A 90M | 41L 67N 74IV 103N 108I 118I 181C 184V 210W 215CHRY 219Q | D4T TDF APV/R T20 |
| 6 | 4,67 | 10I 63P 71V 90M | 41L 69D 101Q 108I 118I 181I 184V 210W 215Y | 3TC EFV FPV/R T20 |
| 7 | 5,19 | Wild type | Wild type | AZT 3TC LPV/R T20 |
| 8 | 5,7 | 10I 32IV 47IV 54IMV 63P 71V 77I 82A 90M | 67G 70G 74I 101X 106IV 179IV 181CY 184V 190S 215Y | 3TC D4T ATV T20 |
| 9 | 5,7 | 10I 36I 46I 54V 63P 71V 84V 90M | 41L 67N 75I 184I 208Y 210W 215Y | 3TC DDI FPV/R T20 |
| 10 | 5,38 | 10I/V 36I 46I 47V 71T 82A 90M | 41L 44D 67N 75M 106A 118I 190A 210W 215Y 227L | 3TC D4T TDF LPV/R T2 |
| 11 | 5,7 | 54V 63P 71V 73S 82A 90M | 67N 69D 70R 103N 151M 181C 219Q | 3TC TPV/R T20 |
| 12 | 4,55 | 46I 47V 54V 63P 71V 73S 84V 90M | 41L 44D 67N 101Q 108I 118I 184I 190A 210W 215Y 227L | TDF EFV LPV/R T20 |

Tabella 8 Carica virale e mutazioni di resistenza agli inibitori di PR e di RT nei 12 pazienti sottoposti a trattamento con T20

La variazione di carica virale a tre mesi dall'inizio del regime terapeutico includente T20 è stata statisticamente significativa (da 5.21 ± 0.48 a 4.29 ± 1.20 log HIV RNA/ml; $P = 0.007$, paired t test). Tuttavia solo, in 5 (41.7%) pazienti la diminuzione di HIV-1 RNA ha superato un ordine log di grandezza e, secondo la più stretta definizione di risposta ottimale in base alla completa assenza di viremia, solo un paziente (0.8%) può essere considerato 'responder' completo. L'analisi del genotipo HIV nella regione 36-45 della gp41 negli 11 soggetti con viremia rilevabile a tre mesi dall'inizio del trattamento ha evidenziato la selezione di una o più mutazioni di resistenza al T20 in 10 (90.9%) casi (Fig. 31). Inoltre, l'unico caso con genotipo wild type in questa regione non è stato caratterizzato da una diminuzione di viremia particolarmente evidente (solo -0.25 log), configurando l'ipotesi che la mancata selezione di ceppi T20-resistenti possa essere derivata da scarsa aderenza alla terapia piuttosto che alla buona efficacia della stessa. L'analisi di regressione logistica condotta su questo piccolo gruppo di pazienti, considerando come successo del trattamento una diminuzione della carica virale di oltre 1 log ($n = 5$), non ha individuato un ruolo significativo, né per la viremia al baseline, né per l'attività prevista, degli altri farmaci utilizzati in combinazione con il T20.

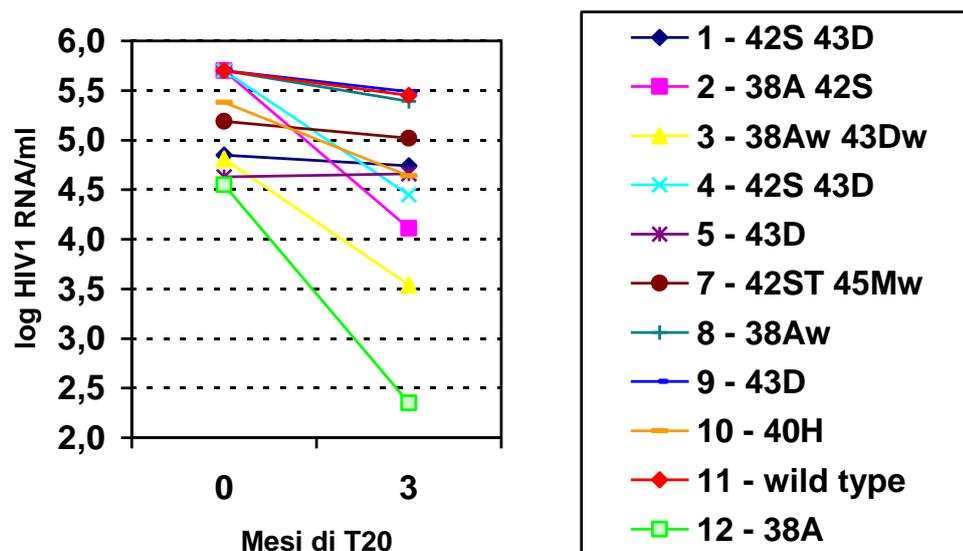


Fig. 31 Andamento della carica virale e insorgenza di mutazioni di resistenza al T20 negli 11 pazienti nei quali non si è ottenuto il controllo della replica virale.

Sviluppo di un saggio ricombinante per la misurazione della capacità replicativa di mutanti farmacoresistenti

La valutazione delle farmacoresistenze contribuisce ad una più efficiente gestione clinica del paziente (Perrin *et al.*, 1998; Torre *et al.*, 2002). Attualmente è in corso l'allestimento di un saggio per la valutazione della fitness replicativa dei mutanti virali resistenti ai PI e/o RTI, basato sulla competizione in coltura fra un ceppo di riferimento (wild type) e il ricombinante virale in esame. La disponibilità di questo strumento di indagine permetterà di esaminare i rapporti fra farmacoresistenza e fitness replicativa supportando l'interpretazione del profilo di resistenza con una valutazione relativa di fitness per una stima più corretta del potere patogeno del ceppo clinico.

Per lo sviluppo del vettore retrovirale ricombinante e wild type HIV-1 è stato utilizzato il plasmide pNL4-3 (circa 14 kb). Al fine di ottenere il ceppo mutante, il plasmide di riferimento è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRI* e *SpeI* generando due frammenti di 4236 bp e 10643 bp. Parallelamente anche il plasmide BCSK+ è stato digerito con le stesse endonucleasi *EcoRI-SpeI* (Fig. 32). Abbiamo scelto di utilizzare tale plasmide più piccolo come 'shuttle' per inserire il frammento di nostro interesse su cui poter effettuare più agevolmente le varie tappe di mutagenesi.

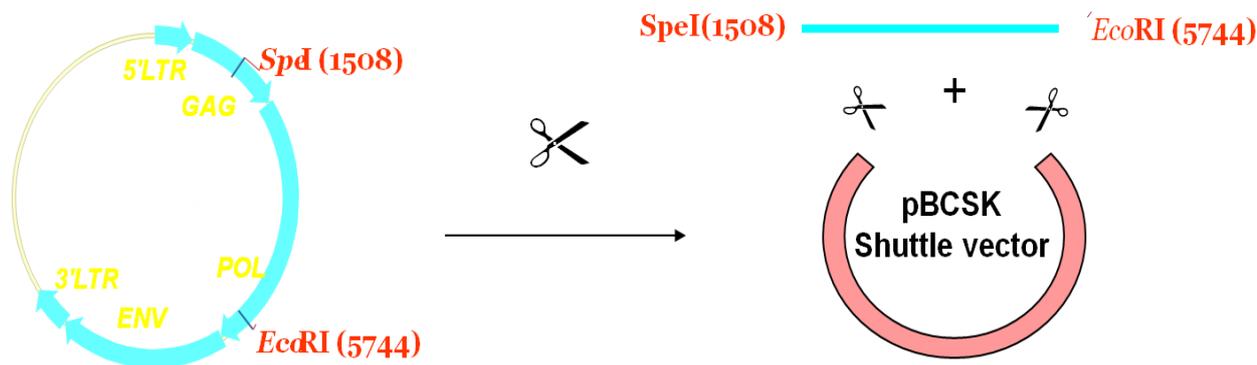


Fig. 32 Digestione dei plasmidi NL4-3 e BCSK+ con EcoRI+SpeI e successiva ligation del frammento di 4Kb di pNL4-3 nello 'shuttle vector'

In seguito alla digestione enzimatica, i plasmidi sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel d'agarosio e, dopo la purificazione dei frammenti, si è proceduto alla ligation dell'inserto EcoRI-SpeI del pNL4-3 nel plasmide pBCSK+. Si è trattato di una ligation direzionata, in quanto le estremità del frammento di pNL4-3 e quelle del vettore sono state prodotte utilizzando gli stessi enzimi.

I prodotti della ligation sono stati utilizzati per la trasformazione batterica; i plasmidi, purificati dalle colonie, sono stati analizzati tramite restrizione enzimatica per identificare quelli contenenti il frammento giusto.

Sul costrutto ottenuto è stata eseguita mutagenesi sito specifica utilizzando il kit Quik Change Multi Site-Directed basato sulla PCR: l'inserto del pNL4-3 rappresenta il template per una PCR diretta da due primers complementari allo stampo eccetto per i nucleotidi che definiscono la mutazione che inserisce due siti di restrizione unici, *PacI* e *XbaI* (Fig. 33).

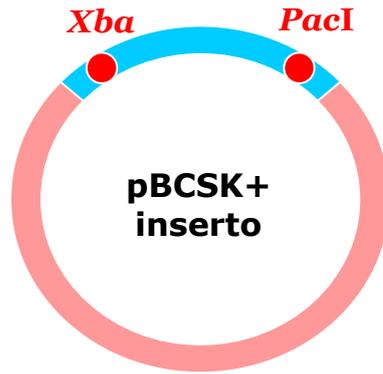


Fig. 33 Plasmide BCSK+ con inserto mutagenizzato.

L'introduzione di questi siti di taglio è eseguita in modo da non alterare la sequenza aminoacidica e permette di rimuovere tale pezzo dal plasmide wild-type per poterlo sostituire con un frammento clinico, il quale viene amplificato con una coppia di primers che contengono all'interno della sequenza i siti di restrizione *PacI* e *Xba*.

L'inserto con le opportune mutazioni è stato nuovamente inserito nel plasmide originario pNL4-3 (Fig.34).

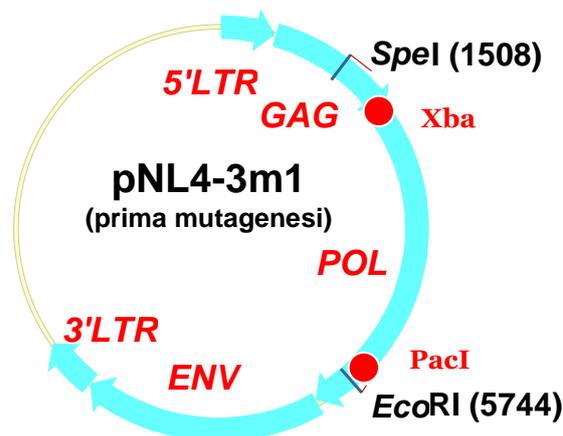


Fig. 34 pNL4-3 con prima mutagenesi per introdurre inserto clinico.

Del costrutto pNL4-3 mutagenizzato (pNL4-3m1) è stato amplificato un frammento nella regione *gag* di circa 700 bp e clonato nel vettore pGEM-T (fig. 35).

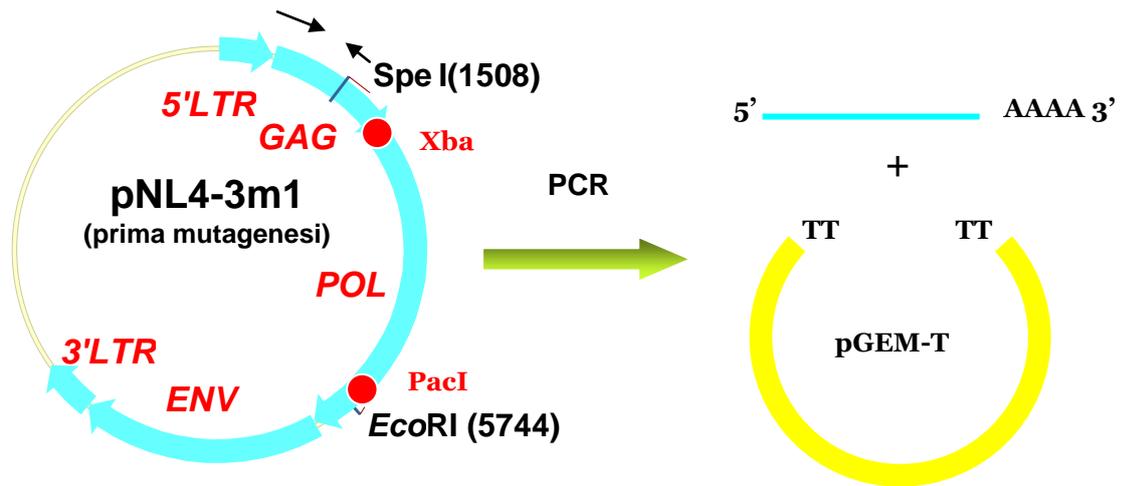


Fig.35 Clonaggio del frammento di PCR nel pGEM-T.

Con lo stesso sistema sopra citato, nel vettore 'shuttle' sono state introdotte cinque mutazioni silenziose per creare un target per il riconoscimento da parte di una sonda Taqman in modo da discriminare il pNL4-3 wild-type da quello con l'inserto clinico (fig. 37). Il saggio per la valutazione della 'fitness' replicativa è basato infatti sulla competizione in coltura fra il virus ricombinante, che esprime i prodotti della regione derivata dal campione clinico, e il virus di riferimento NL4-3. Il rapporto fra le efficienze replicative dei due virus verrà misurato tramite quantificazione relativa dei due tipi di sequenza che contraddistinguono i due ceppi virali in competizione.

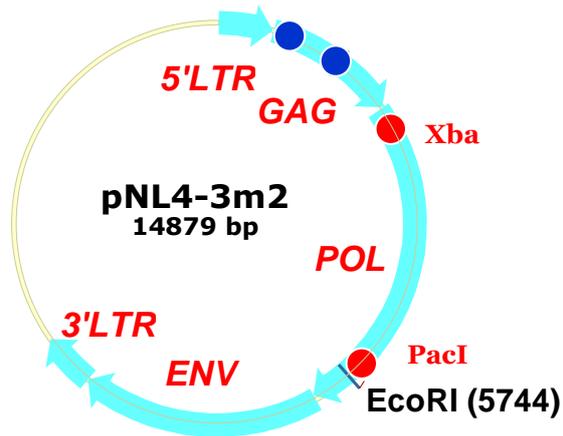


Fig.37 Costrutto finale del pNL4-3 in cui si inserisce il frammento clinico.

Il progetto è stato finora sviluppato fino alla costruzione del vettore pNL4-3 mutagenizzato che accoglie l'inserto clinico. Sono in fase di esecuzione una serie di esperimenti intesi a valutare (i) l'efficienza della ricombinazione vs. clonaggio per ottenere il plasmide chimerico che incorpora l'inserto di derivazione clinica, (ii) la scelta del tipo di linea cellulare per l'infezione mista, (iii) le condizioni ottimali per la distinzione fra i due virus tramite real-time PCR con le due sonde differenziali.

DISCUSSIONE

Circolazione dei sottotipi non-B e studio di un isolato di interesse dal punto di vista filogenetico

L'analisi della casistica accumulata in circa 10 anni di attività del servizio di genotipizzazione di HIV-1 per la stima della farmacoresistenza (dati da 3485 pazienti) ha permesso di tracciare la circolazione dei sottotipi non-B nel bacino di utenza del Servizio di Virologia dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, identificabile con la quasi totalità delle richieste di Toscana e Umbria ma esteso all'intero territorio nazionale attraverso la collaborazione con numerosi centri di infettivologia italiani. E' evidente che, come anche per altri paesi europei, la prevalenza del sottotipo B in Italia non è più così preponderante come fino a pochi anni fa. A fronte di una totale assenza di forme non-B fino al 1995, dal 1996 in poi la frequenza con cui si riscontrano i ceppi non-B è andata aumentando fino a raggiungere quasi il 20% nell'anno in corso. Deve essere precisato che su tale stima pesa il criterio adottato per la collocazione temporale dei vari dati di sequenza. In assenza della conoscenza della data di infezione per la gran parte dei pazienti, non è infatti possibile monitorare l'effettiva incidenza del parametro. L'approccio utilizzato, considerare l'anno del primo test di genotipizzazione effettuato per ogni paziente, non può quindi fornire dati reali in termini di prevalenza e comparsa dei vari ceppi non-B ma può assai convincentemente indicare l'andamento temporale del fenomeno. In considerazione del tempo di latenza che può mediamente intercorrere fra l'effettiva data di infezione e la prima genotipizzazione, in linea di massima coincidente con la necessità di inizio o di cambio di terapia, è ragionevole stimare che la curva di aumento temporale delle infezioni da ceppi non-B possa essere retrodatata di 3-6 anni rispetto a quanto dedotto sulla base della prima caratterizzazione genetica disponibile.

Andamenti suggestivi di un aumento della circolazione dei sottotipi non-B in Europa sono stati segnalati in Albania, in Belgio e in Francia: nel secondo caso è stata documentata una variazione della popolazione dei pazienti infettati da sottotipi non-B dallo 0% del 1983 al 57% del 2001 (Snoeck *et al.*, 2004); in Francia nella coorte di Lione l'incidenza dei sottotipi non-B è salita fino al 40% dei pazienti infettati nel 2003 (Granjean *et al.*, 2005), mentre in Albania uno studio su un campione di 72 isolati ha mostrato che i sottotipi non-B erano presenti nel 65,2% dei casi (Ciccozzi *et al.*, 2005). In generale, è evidente che le fonti ufficiali di monitoraggio della circolazione dei sottotipi non-B in Europa sono aggiornate con notevole ritardo, presentando in diagrammi e siti web una situazione ancora quasi esclusivo appannaggio del sottotipo B in vari paesi dove la diversità di HIV è già ben apprezzabile.

Nella casistica non-B esaminata è stato riscontrato un numero considerevole di URF (9%), forme non classificabili come nessuno dei sottotipi e CRF finora codificate. Ciò indica che (i) la ricombinazione fra sottotipi diversi è un fenomeno diffuso, espressione di una continua esplorazione evolutiva da parte di HIV-1, (ii) la coinfezione o superinfezione, presupposti indispensabili per la generazione di ricombinanti in vivo, si verificano probabilmente con una frequenza superiore a quanto generalmente stimato (Hu *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005) e (iii) il successo evolutivo di una URF, consistente nel suo consolidamento in CRF, è invece comparabilmente assai raro.

Proprio dall'esistenza delle URF derivano i maggiori problemi di accuratezza nell'uso della semplice omologia nucleotidica come sistema per la designazione di sottotipo. Questo metodo di analisi si è notevolmente diffuso come strumento per acquisire rapidamente, e senza grandi competenze sul tema, l'informazione sul sottotipo nel contesto dell'analisi genotipica comunemente eseguita per la stima della farmacoresistenza agli antiretrovirali, esame ormai entrato a far parte della routine gestionale del paziente con infezione da HIV. L'identificazione della sequenza di riferimento che presenta il massimo di omologia con

quella in esame fornisce necessariamente un risultato univoco che però non può in alcun modo designare una URF. Gli utenti di tali sistemi dovrebbero essere consapevoli di tale limitazione ed essere esortati ad analisi più approfondita, almeno nei casi in cui l'omologia massima individuata sia piuttosto scarsa, ad es al di sotto del 95%. Del resto la casistica esaminata ha evidenziato che problemi di attribuzione del sottotipo in questo contesto coinvolgono occasionalmente anche forme codificate, soprattutto la CRF01_AE, la quale deriva in effetti dalla ricombinazione fra A e un supposto sottotipo E mai riscontrato come forma completa. A supporto invece dell'opportunità di inserire fra le sequenze di riferimento per l'analisi di omologia tutte le CRF note, sono state correttamente individuate con questo semplice metodo varie CRF comprese nel dataset (06, 09, 12, 13). L'inclusione di una valutazione di sottotipo per omologia nei test genotipici deriva dalla facilità di istruzioni e dalla velocità più che accettabile con cui il calcolatore che gestisce l'analisi di resistenza, sia esso un software 'stand-alone' o su web o anche dedicato annesso a un kit commerciale, in opposizione alla complessità e lentezza con cui è eseguita una corretta analisi filogenetica. E' da ritenere senza dubbio lodevole in questo contesto la recente iniziativa intrapresa dalla Rega University di Leuven, Belgio, in collaborazione con Africa Centre of Molecular Virology and Bioinformatics Programme di mettere a disposizione un sistema on-line per l'effettuazione dell' analisi filogenetica (<http://bioafrica.mrc.ac.za/subtypetool/html/subtyping.html>).

La disponibilità di una fra le più ampie casistiche di sottotipi non-B ha consentito di trattare la stessa non solo come dataset cumulativo, assolutamente artificioso poiché non ha alcun senso biologico considerare equivalenti tutti i vari non-B, CRF e URF, ma anche come sottoinsiemi di specifici sottotipi per i casi a numerosità più consistente. In tal modo, anche limitandosi a semplici notazioni demografiche, sono state evidenziate notevoli diversificazioni di distribuzione fra i vari ceppi e fattori come sesso e nazionalità dei pazienti. In particolare, la più elevata prevalenza contestuale di nazionalità italiana e genere maschile nel caso

dei sottotipi F e CRF01_AE sembra più che compatibile con una via di ingresso di queste varianti attraverso esposizione sessuale a partner femminili dell'Est europeo e del Sud-Est asiatico. Viceversa la prevalenza di pazienti di sesso femminile, la quasi totalità di provenienza centroafricana, per la CRF02_AG è da mettere in relazione con i recenti flussi immigratori ma parrebbe suggerire una minore penetrazione di questa variante nella popolazione italiana. Nonostante questi suggerimenti debbano ovviamente trovare conferma in casistiche più ampie e soprattutto maggiormente corredate di informazioni, è evidente che l'analisi delle varie forme di HIV circolanti fornisce dati di primaria importanza con possibili ricadute sulle strategie di contenimento della trasmissione dell'infezione.

L'individuazione della variante n. 60000 come possibile rappresentante di un anello evolutivo non ancora caratterizzato, la relazione fra i ceppi A1 del centro Africa e quelli che hanno ultimamente colonizzato l'ex Unione Sovietica (Masharsky *et al.*, 2003), mette in risalto le potenzialità dell'analisi filogenetica. In base all'indicazione preliminare derivata dal gene *pol*, è stato possibile ottenere l'intera sequenza di questo genoma virale a partire da DNA da PBMC. Pur non escludendo la possibilità di utilizzare con successo RNA estratto da plasma, campione tipicamente inviato e conservato per l'analisi genotipica della resistenza, la maggiore stabilità del DNA e la maggiore processività della polimerizzazione del DNA rispetto alla retrotrascrizione in vitro rendono il DNA certamente più adatto allo scopo. La conservazione di DNA appare quindi una buona procedura per consentire analisi genetiche non routinarie che venissero ad essere successivamente considerate.

L'analisi del campione n. 60000 ha portato ad un risultato molto interessante dal punto di vista evolutivo, meritevole di ulteriori approfondimenti attraverso indagini di 'molecular clock' al fine di valutare quale relazione temporale esiste fra il campione analizzato e i ceppi A1 russi caratterizzati e presenti nei database di riferimento. Alla luce dei risultati ottenuti tramite analisi filogenetica, è prevedibile che si possa

confermare l'esistenza di una relazione evolutiva fra il campione n. 60000 e i ceppi A1 circolanti nei paesi dell'ex URSS (Masharsky *et al.*, 2003). Per conferire una maggiore validità a questi risultati, sarebbe opportuno riuscire a caratterizzare altri isolati con elevata omologia di sequenza rispetto al campione n. 60000 in pazienti originari dell'Africa equatoriale occidentale e non esposti a contatti con persone dell'est europeo.

La caratterizzazione del ceppo n. 60000 dimostra che l'analisi filogenetica (a differenza della semplice omologia di sequenza) del solo gene *pol* può fornire un'informazione piuttosto esaustiva nonostante il frammento considerato rappresenti normalmente non più di un sesto dell'intero genoma virale. Al di là delle critiche di parzialità in parte opportune (Sturmer *et al.*, 2004), la filogenesi sulle sequenze *pol*, oggi prodotte dalla normale attività assistenziale per la maggior parte dei reparti di infettivologia, è quindi un'utile strumento di indagine supplementare ed è quindi auspicabile organizzarne e standardizzarne l'uso a beneficio di una migliore comprensione dell'epidemiologia molecolare di HIV-1.

Valutazione dell'insorgenza della resistenza all' enfuvirtide

Nei pazienti trattati con enfuvirtide analizzati nella nostra casistica non è stato possibile ottenere un controllo completo della replicazione di HIV (solo nello 0,8% dei casi). Questo può essere dipeso dal fatto che la terapia con enfuvirtide è stata iniziata troppo tardi, ossia quando i soggetti in questione avevano già un quadro di resistenza ai vari antiretrovirali molto esteso e quindi quando la terapia con il T20 si profilava come una 'monoterapia', nonostante l'ottimizzazione del regime terapeutico mediante test di resistenza.

E' stato suggerito (Hornberger, 2006) che una buona risposta virologica all'enfuvirtide si raggiunge di solito in pazienti che hanno:

- carica virale <5 Log copie/ml,
- conta CD4+ >100 cellule/ μ l,

- trattamenti precedenti con meno di 10 antiretrovirali o almeno più di 2 farmaci nel regime di background verso cui si prevede una risposta ancora apprezzabile.

Sarebbe quindi auspicabile iniziare il trattamento con enfuvirtide in associazione con farmaci possibilmente ancora attivi, giacché l'introduzione di un farmaco nuovo come monoterapia comporta logicamente un rapido sviluppo di farmacoresistenza. In questo contesto enfuvirtide appare, infatti, essere un farmaco a bassa barriera genetica.

Valutazione comparativa di DNA da linfociti e RNA da plasma per l'individuazione di mutanti farmacoresistenti in soggetti naive

La dinamica dell'infezione da HIV suggerisce che la fase iniziale di resistenza possa essere più precocemente individuata tramite analisi della popolazione virale plasmatica piuttosto che cellulare. Il modello della selezione prevede che le varianti resistenti originate in una minoranza di cellule sede di replica virale (in teoria anche solo una) siano preferenzialmente amplificate andando a costituire la grande maggioranza della popolazione circolante nel plasma. La rapidità con cui questa stessa popolazione colonizza nuovi elementi cellulari determina poi la durata del periodo in cui l'individuazione delle mutazioni di resistenza nei due compartimenti fornisce risultati discrepanti. A testimonianza di ciò, una significativa differenza in tal senso è stata rilevata selezionando campioni prelevati precocemente in corso di primo fallimento virologico di HAART (Venturi *et al.*, 2002) ma non in assenza di tale criterio di selezione (Chew *et al.*, 2005).

La popolazione esaminata nel nostro studio costituisce una casistica ben diversa da quella dei pazienti trattati. In seguito alla sospensione di trattamento, la rilevabilità delle mutazioni di resistenza nel comparto plasmatico decade più velocemente di quanto non accada in sede intracellulare, in connessione con la più lunga emivita dei genomi virali (soprattutto quelli integrati) nei PBMC rispetto a quelli a bordo dei virioni

circolanti (Venturi *et al.*, 2002). La principale causa di questa osservazione è probabilmente costituita dalla ricomparsa della popolazione virale wild type (precedentemente archiviata) dotata di maggiore fitness in assenza della pressione farmacologica. La situazione del paziente naive infettato con ceppo resistente può essere assimilata alla cessazione di terapia (la terapia in corso nel paziente fonte di infezione) con la differenza che in questo caso si può essere in presenza di una popolazione virale resistente 'pura', lo smaltimento della quale richiede uno o più eventi di vera e propria retromutazione, certamente meno rapida della ricomparsa di un ceppo wild type già presente. In effetti, l'unica analisi finora pubblicata (Ghosn *et al.*, 2006) riguarda 44 pazienti con infezione primaria ed evidenzia un solo caso nel quale la popolazione virale nel compartimento cellulare ha una mutazione in più (M184V) rispetto alla controparte plasmatica. Nel mio studio, l'inclusione di pazienti in larghissima misura con infezione cronica ha invece evidenziato una consistente quota di casi (11 su 35; 31%) con un maggior numero di mutazioni di resistenza nella popolazione virale intracellulare. E' evidente che la casistica esaminata costituisce nel nostro caso una semplice rappresentatività della situazione clinica ordinaria, piuttosto che una selezione restrittiva come nello studio di Ghosn *et al.* Poiché il tema in questione è l'opportunità dell'uso del DNA da PBMC per la genotipizzazione HIV nei soggetti naive, i risultati della nostra analisi rivestono maggiore pertinenza in questo contesto.

Deve essere tuttavia rilevato che, nonostante una significativa maggiore sensibilità dell'analisi su PBMC nei confronti di quella su plasma, sono stati individuati anche tre casi con andamento opposto a quello atteso. Ciò indica che in definitiva sostituire l'analisi su plasma con quella su PBMC potrebbe impedire l'individuazione di rari casi nei quali la popolazione virale resistente è al di sopra della soglia di sensibilità nel solo compartimento plasmatico. Nonostante questi risultati siano stati confermati da un secondo sequenziamento di popolazione, è anche possibile che in entrambi i compartimenti le due varianti virali siano in equilibrio vicino alla soglia di sensibilità del test. La rilevanza del tema

della trasmissione di infezione da HIV sostenuta da ceppi resistenti e le sue conseguenze, sia in termini di gestione terapeutica del paziente sia in termini di farmacoeconomia (Weinstein *et al.*, 2001), esorta ad una più estesa analisi al fine di migliorare ulteriormente lo strumento analitico che costituisce forse il miglior successo applicativo della diagnostica molecolare in campo infettivologico.

Allestimento e prospettive future sul saggio di fitness replicativa

La relazione fra insorgenza di resistenza e modulazione della fitness replicativa è argomento di grande interesse stante la notevole frequenza con cui si riscontrano ceppi virali multiresistenti non più adeguatamente controllabili dalla terapia antiretrovirale. Nonostante lo sviluppo di farmaci di nuove classi aumenti considerevolmente la possibilità di soppressione della replica virale anche in alcuni casi pesantemente compromessi, le modalità di evoluzione di HIV-1 in vivo garantiscono in generale una serie di vie di fuga dalla pressione farmacologica nel lungo termine. Lo spazio genetico che HIV-1 può continuamente esplorare contestualmente alla propria replicazione è tuttavia irregolarmente sviluppato su un insieme di “picchi” e “valli” che condizionano lo spostamento al suo interno. Mutanti resistenti possono in tal modo essere costretti in uno spazio limitato anche in seguito ai meccanismi di compensazione che tipicamente ripristinano almeno parzialmente le funzionalità enzimatiche in parte compromesse dalle mutazioni di resistenza (Verheyen *et al.*, 2006; van Maarseveen *et al.*, 2007; Cong *et al.*, 2007). Ciò configura la possibilità di mantenere una determinata quasispecie virale o forzare l’evoluzione del virus verso uno specifico percorso in modo da limitare la fitness virale nei pazienti in cui il controllo completo della replica virale non è più raggiungibile, in attesa di potere utilizzare nuovi farmaci all’interno di un regime adeguatamente potente.

Lo studio dell’impatto delle mutazioni di resistenza sulla fitness replicativa è stato fortemente rallentato dalla mancanza di test con le doti

di praticità e riproducibilità idonee ad un'utilizzazione clinica. Fra i vari saggi proposti (Quinones-Mateu *et al.*, 2002), i sistemi competitivi garantiscono una migliore capacità risolutiva nei confronti di differenze che, pur modeste in vitro (non rilevabili con sistemi non competitivi), possono rivestire importanza in vivo. La possibilità di discriminare i due genomi virali in competizione mediante due sonde Taqman differenziali rende la fase di rivelazione sufficientemente pratica. Completata la fase di costruzione dei vettori necessari, la mia prossima attività sarà intesa a valutare estensivamente le varie tappe del test, dalla generazione del virus ricombinante in cellule 293FT alla tempistica di analisi della coltura mista.

I vettori disegnati e realizzati per il saggio di fitness e il contestuale studio dei parametri implicati nelle fasi di amplificazione, ricombinazione, rivelazione potranno, infine, essere utili anche per lo sviluppo di sistemi per la valutazione della suscettibilità agli antiretrovirali in vitro. La prossima disponibilità di farmaci per i quali le conoscenze dei fenomeni di resistenza è ancora limitata (es. inibitori di integrasi) e/o genotipicamente molto complessa (es. antagonisti dei corecettori) rende, infatti, decisamente auspicabile poter disporre di tali metodiche all'interno di un laboratorio dedicato al monitoraggio della farmaco-resistenza agli antiretrovirali.

BIBLIOGRAFIA

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

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

Amendola A, Bordi L, Angeletti C, Visco-Comandini U, Abbate I, Cappiello G, Budabbus MA, Eljhawi OA, Mehabresh MI, Girardi E, Antinori A, Ippolito G, Capobianchi MR. Underevaluation of HIV-1 plasma viral load by a commercially available assay in a cluster of patients infected with HIV-1 A/G circulating recombinant form (CRF02). *J. Acquir Immune Defic. Syndr.* 2002; 31:488-94.

Apetrei, C., Loussert-Ajaka, I., Descamps, D., Damond, F., Saragosti, S., Brun-Vezinet, F., Simon, F. Lack of screening test sensitivity during HIV-1 non-subtype B seroconversion. *AIDS* 1996; 10:F57-F60.

Aquaro S, D'Arrigo R, Svicher V, Perri GD, Caputo SL, Visco-Comandini U, Santoro M, Bertoli A, Mazzotta F, Bonora S, Tozzi V, Bellagamba R, Zaccarelli M, Narciso P, Antinori A, Perno CF. Specific mutations in HIV-1 gp41 are associated with immunological success in HIV-1-infected patients receiving enfuvirtide treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58:714-22.

Arthur LO, Bess JW Jr, Sowder RC 2nd, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 1992; 258: 1935-8.

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

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

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

Bour S, Geleziunas R, Wainberg MA. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol. Rev.* 1995; 59:63-93.

Braithwaite RS, Shechter S, Roberts MS, Schaefer A, Bangsberg DR, Harrigan PR, Justice AC. Explaining variability in the relationship between antiretroviral adherence and HIV mutation accumulation. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58:1036-43.

Brown PO. Integration of retroviral DNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1990; 157:19-48.

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

Carr A, Cooper DA. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet* 2000; 356:1423-30.

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

Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* 1996; 28;85:1135-48.

Choe H. Chemokine receptors in HIV-1 and SIV infection. *Arch. Pharm. Res.* 1998; 21:634-9.

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

Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science.* 1985; 233:343-6.

Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 27;267:483-9.

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

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

Collins KL, Chen BK, Kalams SA et al. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 1998; 391:397-401.

Cong ME, Heneine W, Garcia-Lerma JG. The fitness cost of mutations associated with human immunodeficiency virus type 1 drug resistance is modulated by mutational interactions. *J Virol.* 2007; 81:3037-41.

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

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

D'Aquila Richard T., MD, Jonathan M. Schapiro, MD, Françoise Brun-Vézinet, MD, PhD, Bonaventura Clotet, MD, PhD, Brian Conway, MD, Lisa M. Demeter, MD, Robert M. Grant, MD, MPH, Victoria A. Johnson, MD, Daniel R. Kuritzkes, MD, Clive Loveday, MD, PhD, Robert W. Shafer, MD, and Douglas D. Richman, MD. Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Topics in HIV Medicine* 2003; 11:92-96.

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

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

Deeks SG. International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J. Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 26 Suppl 1: S25-33.

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

Derdeyn CA, Decker JM, Sfakianos JN, Wu X, O'Brien WA, Ratner L, Kappes JC, Shaw GM, Hunter E. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J. Virol.* 2000; 74:8358-67.

Dionisio D, Vivarelli A, Zazzi M, Esperti F, Uberti M, Polidori M. Extent of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance as a predictor of

virological failure after genotype-guided treatment switch. Clin. Infect. Dis. 2001; 33:706-9.

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

Doms RW, MD. Viral Pathogenesis: HIV attachment and entry. HIV/AIDS Update 2002.

Doms RW, Peiper SC. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. Virology 1997 ; 1;235:179-90.

Dybul M, Fauci AS, Bartlett JG, Kaplan JE, Pau AK, Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV..Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. Ann. Intern. Med. 2002; 137:5 Pt 2 381-433.

Erickson JW, Gulnik SV, Markowitz M. Protease inhibitors: resistance, cross-resistance, fitness and the choice of initial and salvage therapies. AIDS 1999; 13 Suppl A:S189-204.

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

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

Fujita M, Sakurai A, Yoshida A, Miyaura M, Koyama AH, Sakai K, Adachi A. Amino acid residues 88 and 89 in the central hydrophilic region of human immunodeficiency virus type 1 Vif are critical for viral infectivity by enhancing the steady-state expression of Vif. J. Virol. 2003; 77:1626-32.

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

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

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

Gonzales MJ, Wu TD, Taylor J, Belitskaya I, Kantor R, Israelski D, Chou S, Zolopa AR, Fessel WJ, Shafer RW. Extended spectrum of HIV-1 reverse transcriptase mutations in patients receiving multiple nucleoside analog inhibitors. *AIDS* 2003; 17:791-9.

Gottesman, B.S., Grosman, Z., Lorber, M.: Measurement of HIV RNA in patients infected by subtype C by assays optimized for subtype B results in an underestimation of the viral load. *J.Med.Virol.* 2004; 73, 167-171.

Gottlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86:5781-5.

Greenberg M. L., Cammack. Resistance to enfuvirtide, the first HIV fusion inhibitor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 54:333-340.

Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M. 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature.* 326:662-9.

Hammer SM, Saag MS, Schechter M, Montaner JS, Schooley RT, Jacobsen DM, Thompson MA, Carpenter CC, Fischl MA, Gazzard BG, Gatell JM, Hirsch MS, Katzenstein DA, Richman DD, Vella S, Yeni PG, Volberding PA; International AIDS Society-USA panel. Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2006; 296:827-43.

Harrigan PR, Montaner JS, Wegner SA, Verbiest W, Miller V, Wood R, Larder BA. World-wide variation in HIV-1 phenotypic susceptibility in untreated individuals: biologically relevant values for resistance testing. *AIDS* 2001; 15:1671-7.

Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4:868-77.

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

Hertogs K, de Bethune MP, Miller V, Ivens T, Schel P, Van Cauwenberge A, Van Den Eynde C, Van Gerwen V, Azijn H, Van Houtte M, Peeters F, Staszewski S, Conant M, Bloor S, Kemp S,

Larder B, Pauwels R. A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1998; 42:269-76.

Hirsch MS, Brun_Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D_Aquila RT, Demeter LM, Hammer SM, Johnson VA, Loveday C, Mellors JW, Jacobsen DM, Richman DD. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37:113-28.

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

Holguin A, Hertogs K, Soriano V. Performance of drug resistance assays in testing HIV-1 non-B subtypes. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003; 9:323-6.

Hornberger J, Kilby JM, Wintfeld N, Green J. Cost-effectiveness of enfuvirtide in HIV therapy for treatment-experienced patients in the United States. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22:240-7.

Hostomsky Z, Z Hostomska, GO Hudson, EW Wooman and BR Nodes. Reconstitution in vitro of RNase H activity by using purified N-terminal and C-terminal domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88:1148-52.

Huang H, Chopra R, Verdine GL, S.C. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 1998; 282,1669-75.

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

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

Jackson RC. A pharmacokinetic-pharmacodynamic model of chemotherapy of human immunodeficiency virus infection that relates development of drug resistance to treatment intensity. *J. Pharmacokinetic Biopharm* 1997; 25:6 713-30.

Jacob P., Lalezari, MD and Andrew D. Luber. Fusion inhibitors for the treatment of HIV: a new era in HAART. *Critical Issues in HIV* 2004. Link:

http://www.hivandhepatitis.com/essays/011904_hiv_print.htm.

Jagodzinski LL, Cooley JD, Weber M, Michael NL. Performance characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping systems in sequence-based analysis of subtypes other than HIV-1 subtype B. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:998-1003.

Janssens W, Buve A, Nkengasong JN. The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *AIDS* 1997; 11:705-12.

Kellam P, Larder BA. Recombinant virus assay: a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38:23-30.

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

Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein Vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* 1990; 64:621-9.

Kohlstaedt LA, Steitz TA. Reverse transcriptase of human immunodeficiency virus can use either human tRNA(3Lys) or Escherichia coli tRNA(2Gln) as a primer in an in vitro primer-utilization assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 15;89:9652-6.

Larder BA, Bloor S, Kemp SD, Hertogs K, Desmet RL, Miller V, Sturmer M Staszewski S, Ren J, Stammers DK, Stuart DI, Pauwels R. A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1961-7.

Lazzarin A, Clotet B, Cooper D, Reynes J, Arasteh K, Nelson M, Katlama C, Stellbrink HJ, Delfraissy JF, Lange J, Huson L, DeMasi R, Wat C, Delehanty J, Drobnies C, Salgo M; TORO 2 Study Group. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N. Engl. J Med.* 2003; 348:2186-95.

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

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

Leonard JT, Roy K. The HIV entry inhibitors revisited. *Curr. Med. Chem.* 2006;13:911-34.

Letvin NL. Animal models for AIDS. *Immunol. Today* 1990; 11:322-6.

Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347:6 385-94.

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

Loveday C. International perspectives on antiretroviral resistance. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2001; 26 Suppl 1: S10-24.

Lukashov VV, Goudsmit J. HIV heterogeneity and disease progression in AIDS: a model of continuous virus adaptation. *AIDS* 1998; 12 Suppl A: S43-52.

Malim MH, J Huber, Y Less, JV Maizel and BR Cullen. The HIV rev-trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 1989; 338:254-57.

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

Mansky LM. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J. Gen. Virol.* 1998; 79:1337-45.

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

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

Max B, Sherer R. Management of the adverse effects of antiretroviral therapy and medication adherence. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 30 Suppl 2:S96-116.

Melby T, Sista P, DeMasi R, Kirkland T, Roberts N, Salgo M, Heilek-Snyder G, Cammack N, Matthews TJ, Greenberg ML. Characterization of envelope glycoprotein gp41 genotype and phenotypic susceptibility to enfuvirtide at baseline and on treatment in the phase III clinical trials TORO-1 and TORO-2. *AIDS Res Hum. Retroviruses.* 2006; 22:375-85.

Menzo S, Castagna A, Monchetti A, Hasson H, Danise A, Carini E, Bagnarelli P, Lazzarin A, Clementi M. Genotype and phenotype patterns of human immunodeficiency virus type 1 resistance to enfuvirtide during long-term treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48:3253-9.

Mikaelian I, M Krieg, MJ Gait and J Karn. Interaction of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs. *J. Mol. Biol.* 1996; 257:246-64.

Miller M.D., Hazuda Daria J. HIV resistance to the fusion inhibitor enfuvirtide: mechanism and clinical implications. *Drug Resist. Updat.* 2004; 7:89-95.

Miller V, Larder BA. Mutational patterns in the HIV genome and cross-resistance following nucleoside and nucleotide analogue drug exposure. *Antivir. Ther.* 2001; 6 Suppl 3:25-44.

Miller V. Resistance to protease inhibitors. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2001; 26 Suppl 1, S34-50.

Miller V. International perspectives on antiretroviral resistance. Resistance to protease inhibitors. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2001; 26 Suppl 1: S34-50.

Naeger LK, Struble KA. Food and Drug Administration analysis of tipranavir clinical resistance in HIV-1-infected treatment-experienced patients. *AIDS.* 2007 Jan 11;21:179-85.

Nelson M, Arasteh K, Clotet B, Cooper DA, Henry K, Katlama C, Lalezari JP, Lazzarin A, Montaner JS, O'Hearn M, Piliero PJ, Reynes J, Trottier B, Walmsley SL, Cohen C, Eron JJ Jr, Kuritzkes DR, Lange J, Stellbrink HJ, Delfraissy JF, Buss NE, Donatucci L, Wat C, Smiley L, Wilkinson M, Valentine A, Guimaraes D, Demasi R, Chung J, Salgo MP. Durable efficacy of enfuvirtide over 48 weeks in heavily treatment-experienced HIV-1-infected patients in the T-20 versus optimized background regimen only 1 and 2 clinical trials. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005 Dec 1;40:404-12.

Oldfield V, Keating GM, Plosker G. Enfuvirtide: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs.* 2005; 65:1139-60.

Ostrop NJ, Hallett KA, Gill MJ. Long-term patient adherence to antiretroviral therapy. *Ann. Pharmacother.* 2000; 34:703-9.

Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 1998; 26;338:853-60.

Parekh B, Phillips S, Granade TC, Baggs J, Hu DJ, Respass R. Impact of HIV type 1 subtype variation on viral RNA quantitation. *AIDS Res Hum. Retroviruses* 1999; 15:133-42.

Paul M, Mazumder S, Raja N, Jabbar MA. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu transmembrane domain that promotes the enhanced release of virus-like particles from the plasma membrane of mammalian cells. *J. Virol.* 1998; 72:1270-9.

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

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

Peeters M, Sharp PM. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* 2000; 14 Suppl 3: S129-40.

Peeters M, Toure-Kane C, Nkengasong JN. Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 2003; 17:2547-60.

Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271:1582-6.

Petropoulos CJ, Parkin NT, Limoli KL, Lie YS, Wrin T, Huang W, Tian H, Smith D, Winslow GA, Capon DJ, Whitcomb JM. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 ; 44:920-8.

Pierson TC, Doms RW. HIV-1 entry inhibitors: new targets, novel

therapies. *Immunol Lett* 2003; 22; 85:113-8.

Pillay D, Walker AS, Gibb DM, de Rossi A, Kaye S, Ait-Khaled M, Munoz-Fernandez M, Babiker A. Impact of human immunodeficiency virus type 1 subtypes on virologic response and emergence of drug resistance among children in the Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 5 trial. *J. Infect. Dis.* 2002; 186:617-25.

Poles MA, Elliott J, Vingerhoets J, Michiels L, Scholliers A, Bloor S, Larder B, Hertogs K, Anton PA. Despite high concordance, distinct mutational and phenotypic drug resistance profiles in human immunodeficiency virus type 1 RNA are observed in gastrointestinal mucosal biopsy specimens and peripheral blood mononuclear cells compared with plasma. *J. Infect. Dis.* 2001;183:143-8.

Pollard VW, Malim MH. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* 1998; 52:491-532.

Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2005; 4:236-48.

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

Poveda E, Blanco F, Garcia-Gasco P, Alcolea A, Briz V, Soriano V. Successful rescue therapy with darunabir (TMC114) in HIV-infected patients who have failed several ritonavir-boosted protease inhibitors. *AIDS* 2006; 13;20:1558-60.

Poveda E, Rodes B, Labernardiere JL, Benito JM, Toro C, Gonzalez-Lahoz J, Faudon JL, Clavel F, Schapiro J, Soriano V. Evolution of genotypic and phenotypic resistance to Enfuvirtide in HIV-infected patients experiencing prolonged virologic failure. *J. Med. Virol.* 2004; 74:21-8.

Puchhammer_Stockl E, Schmied B, Mandl CW, Vetter N, Heinz FX. Comparison of line probe assay (LIPA) and sequence analysis for detection of HIV-1 drug resistance. *J. Med. Virol.* 1999; 57:283-9.

Quinones-Mateu ME, Arts EJ. Fitness of drug resistant HIV-1: methodology and clinical implications. *Drug Resist Updat.* 2002; 5:224-33.

Raffi F, Katlama C, Saag M, Wilkinson M, Chung J, Smiley L, Salgo M. Week-12 response to therapy as a predictor of week 24, 48, and 96 outcome in patients receiving the HIV fusion inhibitor enfuvirtide in the T-20 versus Optimized Regimen Only (TORO) trials. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 42:870-7.

Razzolini F, Vicenti I, Saladini F, Micheli V, Romano L, Cargnel A, Zazzi M. Natural Variability in the HR-1 and HR-2 Domains of HIV Type 1 Gp41 from Different Clades Circulating in Italy. *AIDS Res Hum. Retroviruses* 2007; 23:558-63.

Rockstroh JK, Mauss S. Clinical perspective of fusion inhibitors for treatment of HIV. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 53:700-2.

Rosen CA, E Terwilliger, A Dayton, J Sodroski and WA Haseltine. Intragenic cis-acting ART gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85:2071-75.

Rosen CA, Sodroski JG, Haseltine WA. The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* 1985; 41:813-23.

Sander O, Sing T, Sommer I, Low AJ, Cheung PK, Harrigan PR, Lengauer T, Domingues FS. Structural Descriptors of gp120 V3 Loop for the Prediction of HIV-1 Coreceptor Usage. *PLoS Comput Biol.* 2007 30;3:e58.

Schwartz S, Felber BK, Fenyo EM, Pavlakis GN. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* 1990; 64:5448-56.

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

Shirasaka T, Kavlick MF, Ueno T, Gao WY, Kojima E, Alcaide ML, Chokekijchai S, Roy BM, Arnold E, Yarchoan R, et al. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995; 92:2398-402.

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

Sista PR, Melby T, Davison D, Jin L, Mosier S, Mink M, Nelson EL, DeMasi R, Cammack N, Salgo MP, Matthews TJ, Greenberg ML. Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *AIDS* 2004; Sep;18:1787-94.

Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, Van Laethem K, Deforche K, Carvalho AP, Wynhoven B, Soares MA, Cane P, Clarke J, Pillay C, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R,

Bouzas MB, Brun-Vezinet F, Reid C, Cahn P, Brigido LF, Grossman Z, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan RP, Camacho R, Schapiro JM, Katzenstein D, Vandamme AM. Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(2):694-701.

Soriano V, de Mendoza C. Genetic mechanisms of resistance to protease inhibitors and entry inhibitors. *HIV Clin. Trials* 2002; 3:249-57.

Strebel K, Klimkait T, Maldarelli F, Martin MA. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *J. Virol.* 1989; 63:3784-91.

Svicher V, Sing T, Santoro MM, Forbici F, Rodriguez-Barrios F, Bertoli A, Beerenwinkel N, Bellocchi MC, Gago F, d'Arminio Monforte A, Antinori A, Lengauer T, Ceccherini-Silberstein F, Perno CF. Involvement of novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations in the regulation of resistance to nucleoside inhibitors. *J. Virol.* 2006; 80:7186-98.

Swanson P, Holzmayer V, Huang S, Hay P, Adebisi A, Rice P, Abravaya K, Thamm S, Devare SG, Hackett J Jr. Performance of the automated Abbott RealTime HIV-1 assay on a genetically diverse panel of specimens from London: comparison to VERSANT HIV-1 RNA 3.0, AMPLICOR HIV-1 MONITOR v1.5, and LCx HIV RNA Quantitative assays. *J. Virol. Methods.* 2006;137:184-92.

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

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

Van Heeswijk RP, Veldkamp A, Mulder JW, Meenhorst PL, Lange JM, Beijnen JH, Hoetelmans RM. Combination of protease inhibitors for the treatment of HIV-1-infected patients: a review of pharmacokinetics and clinical experience. *Antivir. Ther.* 2001; 6:201-29.

van Maarseveen NM, Wensing AM, de Jong D, Taconis M, Borleffs JC, Boucher CA, Nijhuis M. Persistence of HIV-1 variants with multiple protease inhibitor (PI)-resistance mutations in the absence of PI therapy can be explained by compensatory fixation. *J. Infect. Dis.* 2007; 195:399-409.

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

Varmus HE. Reverse transcription in bacteria. Cell 1989; 56:721-4.

Venturi G, Catucci M, Romano L, Corsi P, Leoncini F, Valensin PE, Zazzi M. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and protease from paired cerebrospinal fluid and plasma samples. J. Infect. Dis. 2000; 181:740-5.

Venturi G, Romano L, Carli T, Corsi P, Pippi L, Valensin PE, Zazzi M. Divergent distribution of HIV-1 drug-resistant variants on and off antiretroviral therapy. Antivir. Ther. 2002: 245-50.

Verheyen J, Litau E, Sing T, Daumer M, Balduin M, Oette M, Fatkenheuer G, Rockstroh JK, Schuldenezucker U, Hoffmann D, Pfister H, Kaiser R. Compensatory mutations at the HIV cleavage sites p7/p1 and p1/p6-gag in therapy-naive and therapy-experienced patients. Antivir. Ther. 2006; 11:879-87.

Weber J, Piontkivska H, Quinones-Mateu ME. HIV type 1 tropism and inhibitors of viral entry: clinical implications. AIDS Rev. 2006; 8:60-77.

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

Weinstein MC, Goldie SJ, Losina E, Cohen CJ, Baxter JD, Zhang H, Kimmel AD, Freedberg KA. Use of genotypic resistance testing to guide hiv therapy: clinical impact and cost-effectiveness. Ann. Intern. Med. 2001; 134:440-50.

Wensing AMJ, van de Vijver DAMC, Asjo B, Balotta C, Camacho R, de Mendoza C, Deroo S, Derdelinckx I, Grossman Z, Hamouda O, Hatzakis A, Hoepelman A, Horban A, Korn K, Kuecherer C, Nielsen C, Ormaasen V, Perrin L, Paraskevis D, Puchhammer E, Roman F, Salminen M, Schmit JCC, Soriano V, Stanczak G, Stanojevic M, Vandamme A-M, Van Laethem K, Violin M, Yerly S, Zazzi M, Boucher CAB on behalf of the SPREAD Programme. Prevalence of transmitted drug resistance in Europe is largely influenced by the presence of non-B sequences: analysis of 1400 patients from 16 countries: the CATCH-Study. XII International HIV Drug Resistance Workshop: Basic Principles and Clinical Implications. Cabo del Sol, Los Cabos, Mexico, June 10-14, 2003.

Wilkin TJ, Su Z, Kuritzkes DR, Hughes M, Flexner C, Gross R, Coakley E, Greaves W, Godfrey C, Skolnik PR, Timpone J, Rodriguez B, Gulick RM. HIV type 1 chemokine coreceptor use among antiretroviral-experienced patients screened for a clinical trial of a CCR5 inhibitor: AIDS Clinical Trial Group A5211. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44:591-5.

Wilson JW, Bean P, Robins T, Graziano F, Persing DH. Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: the HIV-GenotypR method, the HIV PRT GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38:3022-8.

Wu TD, Schiffer CA, Gonzales MJ, Taylor J, Kantor R, Chou S, Israelski D, Zolopa AR, Fessel WJ, Shafer RW. Mutation patterns and structural correlates in human immunodeficiency virus type 1 protease following different protease inhibitor treatments. *J. Virol.* 2003; 77:4836-47.

Xu L, Pozniak A, Wildfire A, Stanfield-Oakley SA, Mosier SM, Ratcliffe D, Workman J, Joall A, Myers R, Smit E, Cane PA, Greenberg ML, Pillay D. Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49:1113-9.

Zazzi M, Romano L, Venturi G, Shafer RW, Reid C, Dal Bello F, Parolin C, Palu G, Valensin PE. Comparative evaluation of three computerized algorithms for prediction of antiretroviral susceptibility from HIV type 1 genotype. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 53:356-60.

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

Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD. Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J. Virol.* 1994; 68:2556-69.