



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN

“FARMACOLOGIA E ONCOLOGIA MOLECOLARE”

CICLO XXVII

COORDINATORE Prof. Antonio Cuneo

Ruolo della proteina Tat nell’infezione da HIV:

studi *in vitro* e immunogenicità *in vivo*

Settore Scientifico Disciplinare BIO/10

Dottoranda

Dott.ssa Finessi Valentina

Tutore

Prof. Gavioli Riccardo

Anni 2012/2014

*“Un vincitore è semplicemente un sognatore
che non si è mai arreso”*

Nelson Mandela

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	6
1.1 SISTEMA IMMUNITARIO	6
1.1.1 IMMUNITÀ INNATA	6
1.1.2 IMMUNITA' ADATTATIVA	6
<i>I LINFOCITI.....</i>	<i>7</i>
<i>ATTIVAZIONE LINFOCITARIA</i>	<i>11</i>
<i>TCR, RECETTORI E MOLECOLE ACCESSORIE NELLA RISPOSTA T</i>	<i>13</i>
<i>FATTORI DI TRASCRIZIONE COINVOLTI NELLA RISPOSTA CD4</i>	<i>15</i>
<i>CITOCHINE COINVOLTE NELLA RISPOSTA CD4</i>	<i>15</i>
<i>LINFOCITI B E ANTICORPI.....</i>	<i>15</i>
1.2 HIV	19
1.2.1 CICLO REPLICATIVO DI HIV	20
1.2.2 DISFUNZIONI IMMUNI INDOTTE DA HIV	21
1.2.3 LATENZA E RESERVOIR.....	22
1.2.4 LA PROTEINA TAT	24
<i>STRUTTURA E FUNZIONE</i>	<i>24</i>
<i>ADIUVANZA E PROPRIETA' IMMUNOMODULATORIE DI TAT</i>	<i>25</i>
<i>EFFETTI DI TAT SUI LINFOCITI T, CD4+, CD8+ E CELLULE APC</i>	<i>26</i>
1.2.4 TERAPIE CONTRO HIV/AIDS	26
<i>PREVENZIONE.....</i>	<i>27</i>
<i>RICERCA DI UN VACCINO</i>	<i>28</i>
<i>TAT COME CANDIDATO VACCINALE</i>	<i>30</i>
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	32
2.1 IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO DELLA PROTEINA TAT NELL'INFEZIONE DA HIV	32
2.2 IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO DELLA PROTEINA TAT NELLA GENERAZIONE E NEL MANTENIMENTO DEI RESERVOIR VIRALI.....	32
2.3 VALUTAZIONE PRECLINICA DELL'IMMUNOGENICITA' DELLA PROTEINA TAT E DEL PEPTIDE TAT 1-20	33
3. MATERIALI E METODI	35
3.1 ANALISI IN VITRO	35
3.1.1 <i>PROTEINA TAT</i>	35
3.1.2 <i>LINFOCITI DAL SANGUE PERIFERICO.....</i>	35
3.1.3 <i>PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI T.....</i>	35
<i>PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI T CD4+.....</i>	35
<i>PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI T CD4+ NAIVE</i>	36
<i>PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI T CD4+ CENTRAL MEMORY (Tcm)</i>	37
3.1.4 <i>STIMOLAZIONE DELLE CELLULE T.....</i>	39
<i>PROTOCOLLO SPERIMENTALE E TIME_LINE PER LA CONDIZIONE DI "NON POLARIZZAZIONE"</i>	39

3.1.5	<i>ESTRAZIONE RNA messaggero</i>	40
3.1.6	<i>RETROTRASCRIZIONE</i>	41
3.1.7	<i>REAL-TIME PCR</i>	42
3.1.8	<i>CITOFUORIMETRIA A FLUSSO</i>	44
	<i>ANALISI DI MARKER DI SUPERFICIE</i>	44
	<i>INTRACELLULAR STAINING</i>	45
	<i>PROLIFERAZIONE CELLULARE</i>	45
3.1.9	<i>TEST MTT</i>	46
3.2	ANALISI IN VIVO	47
3.2.1	<i>TAT PROTEINA</i>	47
3.2.2	<i>PEPTIDE DI TAT</i>	47
3.2.3	<i>ANIMALI E STABILIZZAZIONE</i>	47
3.2.4	<i>PROTOCOLLI SPERIMENTALI</i>	47
3.2.5	<i>RACCOLTA DEI CAMPIONI PER LE ANALISI IMMUNOLOGICHE</i>	49
	<i>SIERO</i>	49
	<i>LAVAGGI MUCOSALI</i>	49
3.2.6	<i>ANALISI IMMUNOLOGICHE</i>	49
4.	RISULTATI	51
4.1	IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO DELLA PROTEINA TAT NELL'INFEZIONE DA HIV	51
4.1.1	<i>VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI TAT SULL'ATTIVAZIONE FUNZIONALE DEI LINFOCITI T CD4+</i>	51
4.1.2	<i>VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI TAT SULLA PROLIFERAZIONE E SULLA SOPRAVVIVENZA DEI LINFOCITI T CD4+</i>	53
4.1.3	<i>VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI TAT SU MARKER CHE INDICANO UNO STATO DI ATTIVAZIONE</i>	55
4.1.4	<i>VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI TAT SU FATTORI DI TRASCRIZIONE COINVOLTI NELL'ATTIVAZIONE</i>	56
4.2	IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO DELLA PROTEINA TAT NELLA GENERAZIONE E NEL MANTENIMENTO DEI RESERVOIR VIRALI	59
4.2.1	<i>VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI TAT SULLA DIFFERENZIAZIONE DI LINFOCITI T CD4+ IN ASSENZA DI STIMOLI</i>	59
4.2.2	<i>VALUTAZIONE DI UN MODELLO IN VITRO PER LA GENERAZIONE DI LINFOCITI T CD4+ CENTRAL MEMORY ED EFFETTI DELLA PROTEINA TAT</i>	64
	<i>LINFOCITI T CD4+ NAÏVE</i>	64
	<i>LINFOCITI T CD4+ ARRICCHITI IN EFFETTORI</i>	70
4.3	VALUTAZIONE PRECLINICA DELL'IMMUNOGENICITA' DELLA PROTEINA TAT E DEL PEPTIDE TAT 1-20	74
4.3.1	<i>VALUTAZIONE DI UNA DOSE DIPENDENZA NELL'IMMUNIZZAZIONE CON LA PROTEINA TAT</i>	74
4.3.2	<i>EFFETTI DELLA VIA DI SOMMINISTRAZIONE SULL'IMMUNOGENICITÀ DELLA PROTEINA TAT</i>	76
4.3.3	<i>EFFETTI DELLA VIA DI SOMMINISTRAZIONE SULL'IMMUNOGENICITÀ DI</i>	78

<i>UN VACCINO PEPTIDICO BASATO SULLA PROTEINA TAT</i>	78
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	81
6. BIBLIOGRAFIA.....	87
7. PUBBLICAZIONI	98
8. RINGRAZIAMENTI	103

1. INTRODUZIONE

1.1 SISTEMA IMMUNITARIO

Il Sistema immunitario è un importante meccanismo di difesa del nostro organismo contro batteri, virus e altri microrganismi potenzialmente pericolosi. Tale sistema entra in funzione e si attiva in maniera rapida e specifica in seguito al rilevamento della presenza di un agente patogeno e si compone di una risposta innata ed una adattativa che lavorano in sinergia [1].

1.1.1 IMMUNITÀ INNATA

L'immunità innata è composta essenzialmente da due linee di difesa che svolgono differenti funzioni. Nella prima vengono raggruppati fattori meccanici (cute, mucose e ghiandole) e chimici, citochine e sistema del complemento, che possono eliminare o inibire le proliferazioni di alcune categorie di patogeni. Nella seconda linea di difesa si ritrovano le cellule Natural Killers (NK), le cellule dendritiche, granulociti, macrofagi e componenti cellulari specializzate nel riconoscimento di specifiche strutture microbiche come PAMPs (pathogen associated molecular patterns) e DAMPs (damage associated molecular patterns), identificate da specifici recettori (PRRs) [2,3].

Dopo il riconoscimento delle strutture patogene viene dato il via ad una cascata di eventi che porterà all'attivazione del sistema immunitario, partendo da quelli intracellulari, per poi passare al rilascio di citochine pro-infiammatorie e chemochine e, infine, alla fagocitosi esercitata da macrofagi e cellule dendritiche (figura 1.1).

1.1.2 IMMUNITA' ADATTATIVA

L'immunità adattativa è mediata dai linfociti e viene acquisita solamente in seguito ad una prima esposizione ad uno specifico antigene. I linfociti a loro volta possono essere suddivisi in due gruppi principali: i linfociti B, responsabili della risposta di tipo anticorpale o umorale, quindi del rilascio di anticorpi, ed i linfociti T, che danno origine alla risposta cellulo-mediata.

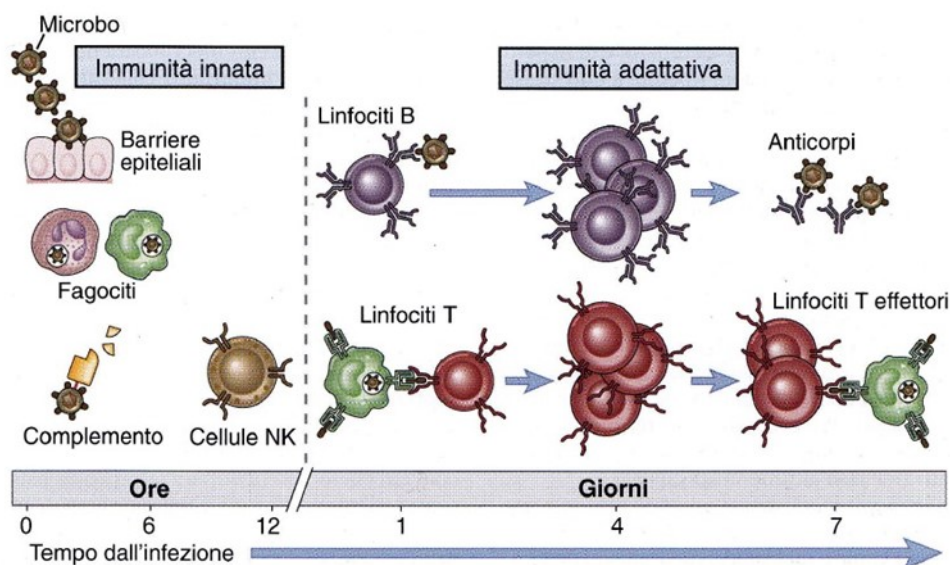


Figura 1.1: Immunità innata e adattativa. I meccanismi dell'immunità innata forniscono le difese iniziali contro le infezioni. Le risposte immunitarie acquisite si sviluppano successivamente e consistono nell'attivazione dei linfociti. Le cinetiche della risposta immunitaria innata ed acquisita sono approssimative e possono variare a seconda del tipo di infezione.

I LINFOCITI

I linfociti sono cellule specializzate del sistema immunitario, aventi un ruolo principale nell'immunità adattativa; si originano nel midollo osseo a partire da cellule staminali ematopoietiche. I linfociti T vengono definiti naive finché non hanno incontrato l'antigene, e si trovano inizialmente nel timo, organo in cui avviene la loro maturazione. In seguito all'incontro con l'antigene, si differenziano all'interno degli organi linfoidi secondari in cellule effettrici. I linfociti B maturano dapprima nel midollo osseo e, a seguito dell'incontro con l'antigene nel torrente circolatorio, si differenziano in plasmacellule.

I linfociti T, a loro volta, possono essere suddivisi in differenti classi:

- linfociti T CD4 helper (Th), in grado di coordinare ed aiutare le risposte immunitarie, andando a produrre proteine specifiche chiamate citochine che favoriscono proliferazione e differenziazione dei linfociti T stessi, linfociti B, macrofagi e leucociti
- linfociti T CD8 citotossici (CTLs), responsabili dell'eliminazione di cellule infettate da virus, tumorali e trapiantate, cioè presentanti antigeni estranei (non-self).

I linfociti T lasciati a riposo sono chiamati anche *resting*: non proliferano, non svolgono funzioni effettrici, non sono distinguibili morfologicamente, anche se sono spesso più piccoli, hanno un grande nucleo e un sottile anello di citoplasma.

LINFOCITI T CD4

I linfociti T CD4 costituiscono il principale gruppo di cellule immunitarie che organizzano la risposta alle infezioni e si suddividono in Th1, Th2, Th17 e Treg in base alle citochine che rilasciano dopo l'incontro con l'antigene [1,3,4], stimolando l'instaurarsi di una risposta umorale o cellulare. Ognuna di queste sottoclassi è coinvolta nella lotta contro specifici microrganismi (figura 1.2).

I Th1 sono coinvolti nella risposta contro patogeni intracellulari [5]; la loro differenziazione è mediata dall'intervento dell'interleuchina 12 (IL-12) che ne favorisce il differenziamento da cellula naive ad effettrice. Queste cellule sono in grado di produrre interferone- γ (IFN- γ) e interleuchina-2 (IL-2). IFN- γ è una citochina importante per l'attivazione dei linfociti T CD8 e dei macrofagi e inoltre favorisce la presentazione e il processamento dell'antigene alle cellule T. IL-2 è importante per il mantenimento della forma memoria e per la sopravvivenza cellulare dei linfociti CD4 e CD8, inducendo l'espressione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 [5]; inoltre IL-2 stimola l'attivazione e la proliferazione dei CD8 e l'espressione di molecole co-stimolatorie sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APCs); infine induce il rilascio di citochine, come IL-4, importanti per la stimolazione e proliferazione di cellule B e NK.

I Th2, invece, mediano la difesa contro parassiti extracellulari e supportano l'azione delle cellule B, portando alla produzione di immunoglobuline M (IgM). La loro induzione è favorita dal rilascio di IL-4 che agisce con un meccanismo a feedback per la produzione di se stessa e di IL-5. Queste ultime citochine vanno di conseguenza a promuovere la produzione di immunoglobuline E (IgE) e l'attivazione e differenziazione degli eosinofili [6].

I Th17 mediano la risposta immunitaria contro organismi extracellulari come funghi e batteri e producono citochine come IL-17, IL-21 e IL-22. La prima va a reclutare e attivare i neutrofili durante la risposta immunitaria [7], mentre la seconda serve da fattore di stimolazione ai Th17 stessi. IL-22 invece media la difesa contro batteri patogeni.

I linfociti T regolatori (Treg) vanno ad inibire la risposta immunitaria evitando situazioni di infiammazione cronica [2].

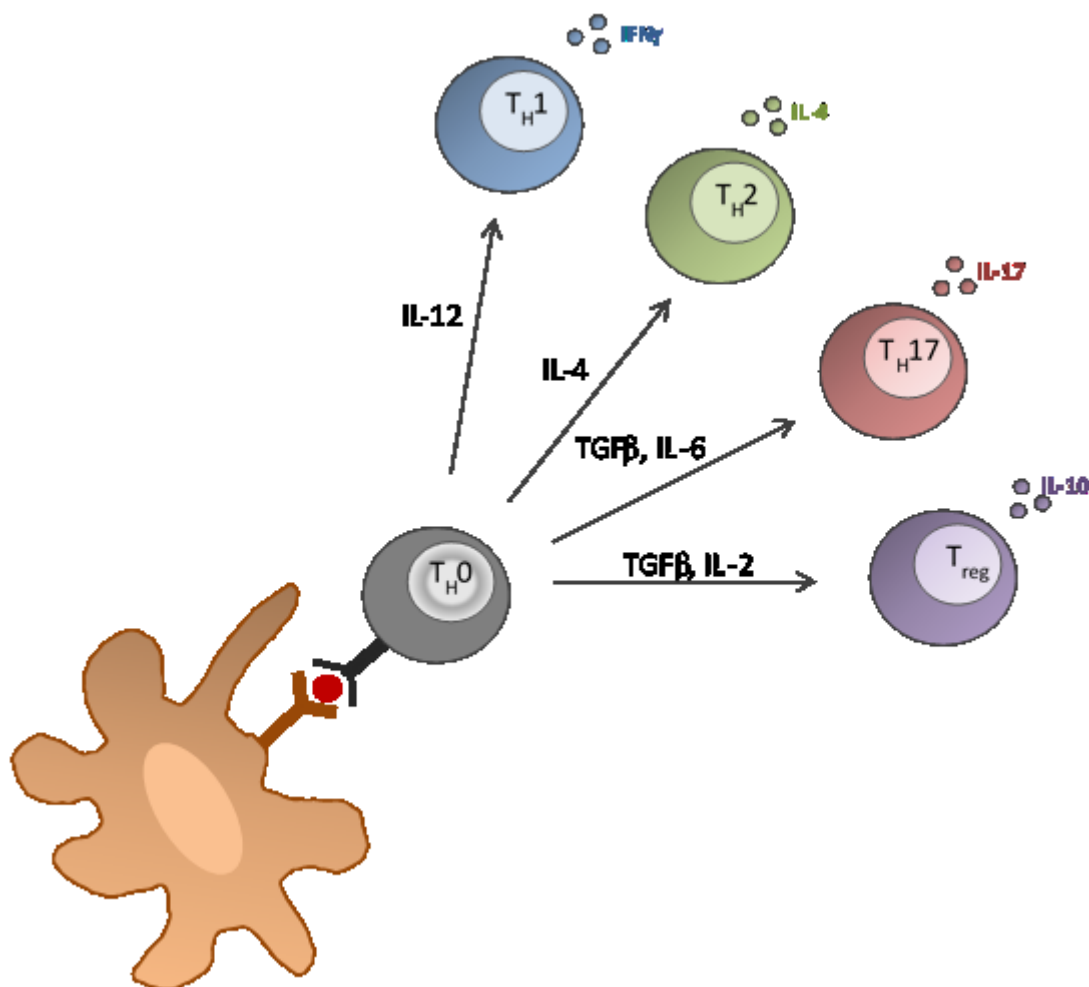


Figura 1.2: Differenziazione dei linfociti T CD4+ dopo l'incontro con l'antigene.

I linfociti T CD4+ possono essere classificati in diverse sottopopolazioni in base alle loro differenti funzioni e alle molecole che esprimono sulla superficie. Sulla base di questi parametri è possibile identificare:

I linfociti T naïve (Tn) sono cellule mature fuoriuscite dagli organi linfoidi primari e che non hanno mai incontrato un antigene. In assenza del riconoscimento di un antigene, queste cellule muoiono nell'arco di 1-3 mesi. Sia i linfociti naïve sia quelli di memoria vengono anche chiamati linfociti a riposo (resting) perché non proliferano e non svolgono funzioni effettrici. Prima di venire stimolati i linfociti T naïve sono in uno stato di quiescenza, o stadio G0 del ciclo cellulare, per poi passare in fase G1 in seguito a stimolazione ed infine dividersi. La sopravvivenza dei linfociti naïve dipende da segnali che si originano in seguito alla stimolazione del recettore per l'antigene, probabilmente da parte di antigeni self, e dalla presenza di citochine [1,2, 57 fabio]. Si pensa che i linfociti T naïve riconoscano diversi antigeni self in un modo sufficientemente debole da dare segnali di sopravvivenza, ma non sufficientemente forte da attivare l'espansione clonale e loro la differenziazione in cellule

effettrici. Alcune proteine secrete, le citochine, i cui recettori sono espressi in modo costitutivo dai linfociti T, sono indispensabili per la sopravvivenza di queste cellule. Tra queste vi è l'interleuchina 7 (IL7), che permette la sopravvivenza e la proliferazione omeostatica delle cellule T naïve. Nell'uomo la maggior parte di questi linfociti esprime un'isoforma di 200 kD di una molecola di membrana detta CD45R, di cui una parte è codificata da un esone chiamato A, perciò chiamata CD45RA. Questa molecola viene utilizzata come marker discriminante tra le cellule T naïve e le cellule T memoria. Un'ulteriore marker di riconoscimento è rappresentato dal CD62L o L-selectina, molecola espressa come recettore di localizzazione linfonoidale per i linfociti naïve, coinvolta nell'homing ai tessuti linfoidi associati all'intestino. Una terza molecola di superficie, utilizzata per identificare le sottopopolazioni di linfociti T e coinvolta nell'homing è il CCR7, che rappresenta un recettore per le chemochine, molecole coinvolte in molteplici funzioni cellulari, quali lo sviluppo e il mantenimento della risposta immunoinfiammatoria. Il riconoscimento dell'antigene da parte delle cellule T naïve determina la riduzione dell'espressione delle molecole necessarie per il loro homing ai linfonodi, come il CD62L e il CCR7[1].

Linfociti T effettori: si originano in seguito all'attivazione dei linfociti naïve e alla loro conseguente differenziazione. Queste cellule sono in grado di produrre molecole, quali granzimi e perforine, che eliminano gli antigeni. I linfociti effettori esprimono sulla loro superficie cellulare molecole che indicano la loro recente attivazione, come il CD25 (catena del recettore per l'interleuchina 2, il fattore di crescita dei linfociti T), il CD69 ed altri marker di attivazione oltre al e le molecole del complesso MHC II. Le cellule effettrici, non essendo più costrette a rimanere nel linfonodo riesprimono alti livelli sia di CCR7 che di CD62L. La maggior parte dei linfociti T effettori differenziati ha vita breve e non si replica [1].

Linfociti T memoria: possono sopravvivere in uno stato di quiescenza o replicarsi molto lentamente anche per molti anni dopo l'eliminazione dell'antigene. Queste cellule possono essere identificate in base all'espressione di proteine di membrana che le distinguono dagli altri tipi di linfociti. Non è ancora del tutto chiaro quali di queste proteine rappresentino marcatori inequivocabili di proliferazione. Nell'uomo, la molecola CD27 costituisce un buon marcatore per questa famiglia di linfociti. Le cellule T memoria esprimono anche molecole di superficie che permettono la loro migrazione nelle sedi di episodi infettivi. Diversamente dalle cellule T naïve, le cellule memoria esprimono un'isoforma di 180 kD del CD45, in cui l'RNA dell'esone A è stato eliminato mediante splicing alternativo; questa forma è chiamata CD45RO. Questo modo di distinguere le cellule T naïve dalle memoria

non è comunque assoluto e sono state descritte popolazioni CD45RA+ che passano a CD45RO+ e viceversa. Le cellule memoria probabilmente mantengono le caratteristiche di homing delle cellule effettrici quindi possono essere identificate con un aumento di livelli di CD62L e CCR7. L'espressione di queste due molecole viene utilizzata come ulteriore elemento discriminante tra le sottopopolazioni dei linfociti T memoria. Le cellule T di memoria, infatti, sono eterogenee per molti aspetti, per questo è possibile riconoscere tre ulteriori sottopopolazioni differenti all'interno di questa classe linfocitaria: T Central Memory, T Effector Memory e T Transitional Memory [1].

Le cellule T CD4+ Central Memory (Tcm), migrano prevalentemente ai linfonodi, dove costituiscono una riserva di linfociti antigene-specifici che può essere attivata rapidamente e quindi proliferare e differenziarsi in cellule effettrici in seguito ad un nuovo incontro con lo stesso antigene. Questa migrazione è rappresentata anche dall'espressione di molecole sulla membrana quali il CCR7, CD62L e il CD27 (molecola di co-attivazione). Nell'uomo, le cellule centrali di memoria sono presenti nel sangue come cellule CD45RA- e CD27+, che esprimono alti livelli di CCR7 +, CD62L+ [9,10,11].

Le cellule T CD4+ Effector Memory (Tem), si localizzano nelle mucose o circolano nel sangue, da cui possono essere facilmente richiamate in qualunque sito di infezione per originare rapidamente risposte effettrici che mirino a eliminare l'antigene. Anche queste cellule esprimono sulla loro superficie cellulare i markers CD45RA, CD27 e CCR7. La differenza risiede nei livelli espressi di queste molecole. Le cellule Tem, infatti, presentano livelli inferiori di espressione di CCR7 e CD62L rispetto alle Tcm, questo accade a causa della diversa localizzazione delle due sottopopolazioni linfocitarie. Nell'uomo quindi queste cellule sono presenti nel sangue come CD45RA-, CCR7- e CD27-.

Infine la sottopopolazione di cellule T CD4+ Transitional memory (Ttm) rappresenta uno stadio intermedio durante la transizione da Tcm a Tem, suggerendo che il loro profilo di espressione, sia dal punto di vista genetico che funzionale, vanta delle caratteristiche riconducibili ai loro precursori (Tcm) ma anche alla sottopopolazione in cui andranno a differenziarsi (Tem). Questa sottopopolazione linfocitaria, quindi, è presente a livello ematico come CD45RA-, CCR7- e CD27+ [9,10,11].

ATTIVAZIONE LINFOCITARIA

I linfociti T svolgono i loro compiti agendo contro specifici antigeni, peptidi prodotti dal sistema cellulare proteolitico e successivamente presentati al TCR (T-cell receptor), presente sulla superficie del linfocita, tramite le molecole di MHC (maggior complesso di

istocompatibilità). Quest'ultimo è suddiviso in due classi di molecole, classe I e classe II, e nell'uomo prende il nome di Human Leukocyte Antigen (HLA) (figura 1.3).

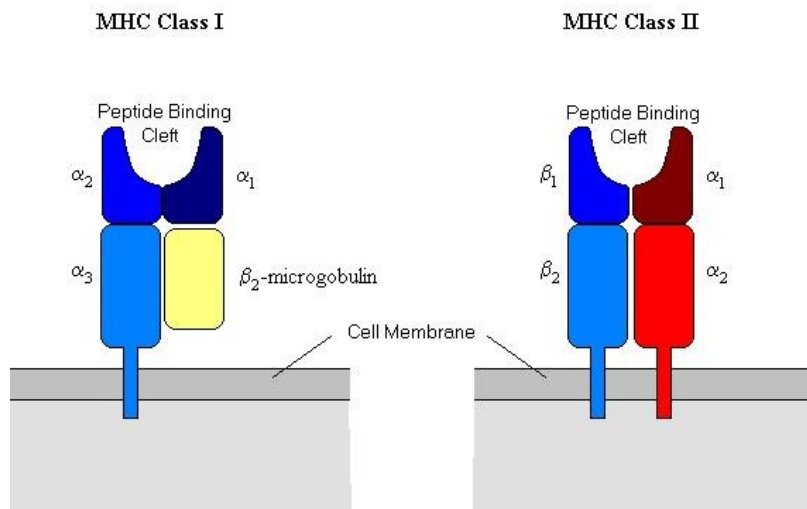


Figura 1.3: Struttura molecolare delle molecole di MHC di classe I e II.

Le molecole MHC di classe I e II sono in grado di riconoscere e distinguere diversi tipi di proteine antigeniche, antigeni citosolici intracellulari ed antigeni extracellulari fagocitati, dimostrando inoltre un comportamento differente nei confronti delle cellule T; in particolare le molecole di classe I presentano gli antigeni ai linfociti T citotossici (CD8) mentre quelle di classe II ai Linfociti T helper (CD4). Entrambe le tipologie sono strutturalmente simili e consistono di una regione extracellulare avente una tasca, capace di legare i peptidi, una regione trans membrana ed una citoplasmatica (figura 1.3).

L'attivazione dei linfociti T dopo l'incontro con l'antigene passa attraverso differenti fasi [12]:

- Attivazione: dopo il riconoscimento dell'antigene come non-self si verifica l'espansione clonale dei linfociti T specifici; il periodo di tempo che comprende questa fase può durare una settimana o poco più, portando quindi il numero dei precursori iniziali a circa un milione di cellule e provvedendo alla formazione di cloni linfocitari, con stessi recettori ed identica specificità-antigenica.
- Contrazione: le risposte T diminuiscono mano a mano che l'antigene viene eliminato; ciò è necessario per ripristinare le condizioni di riposo del sistema immunitario e

avviene principalmente a causa dell'eliminazione dell'antigene, necessario ad attivare il TCR che genera stimoli di sopravvivenza e attivazione. La mancanza di questi stimoli determina successivamente l'apoptosi. In questo modo muore la maggior parte dei linfociti T CD8 che si generano per espansione clonale.

- Memoria: una parte della popolazione T linfocitaria può sopravvivere e dare origine a un terzo tipo cellulare, le cellule della memoria, che in caso di infezioni successive potranno svolgere in maniera rapida una potente risposta immunitaria, avendo già incontrato precedentemente lo stesso antigene (figura 1.4).

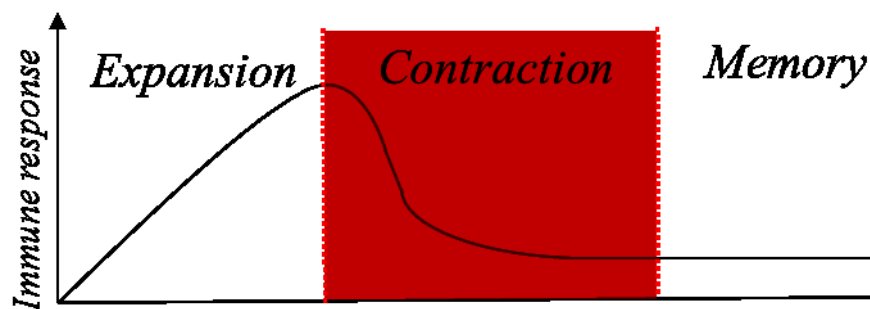


Figura 1.4. Rappresentazione delle fasi della risposta immune dei linfociti T.

Le cellule T memoria, come precedentemente detto, si suddividono in sottopopolazioni [1]: cellule Central Memory (T_{CM}) e cellule Effector Memory (T_{EM}). Il mantenimento dei linfociti T memoria dipende da citochine che sono costitutivamente presenti nei tessuti dell'ospite e che garantiscono un certo livello proliferativo basale a queste cellule. Una di queste citochine è IL-7, necessaria alla sopravvivenza e al mantenimento dei linfociti T CD4 e CD8 memoria.

TCR, RECETTORI E MOLECOLE ACCESSORIE NELLA RISPOSTA T

Il T-cell receptor (TCR) è in grado di riconoscere il complesso MHC-peptide antigenico ed è un recettore clonalmente distribuito, ciò significa che i cloni dei linfociti T dotati di differente specificità esprimono TCR diversi. Il riarrangiamento di segmenti multipli di geni e le varie combinazioni delle subunità α , β , γ e δ hanno portato ad una grande diversità nei TCR, rendendoli in grado perciò di far fronte ad un ampio spettro di molecole antigeniche patogene differenti. Specifiche proteine vanno a trasdurre i segnali dopo il riconoscimento dell'antigene, queste proteine prendono il nome di CD3 e sono legate al TCR (figura 1.5). I linfociti T esprimono in aggiunta anche altri recettori di membrana che non riconoscono l'antigene ma partecipano alla risposta agli antigeni stessi [13]. Queste molecole prendono il nome di molecole accessorie e alcune hanno il compito di inviare segnali, che si aggiungono

a quelli del TCR, per attivare i linfociti T, mentre altre funzionano da molecole di adesione e stabilizzano il legame dei linfociti T alle APC, permettendo così la trasduzione del segnale di attivazione.

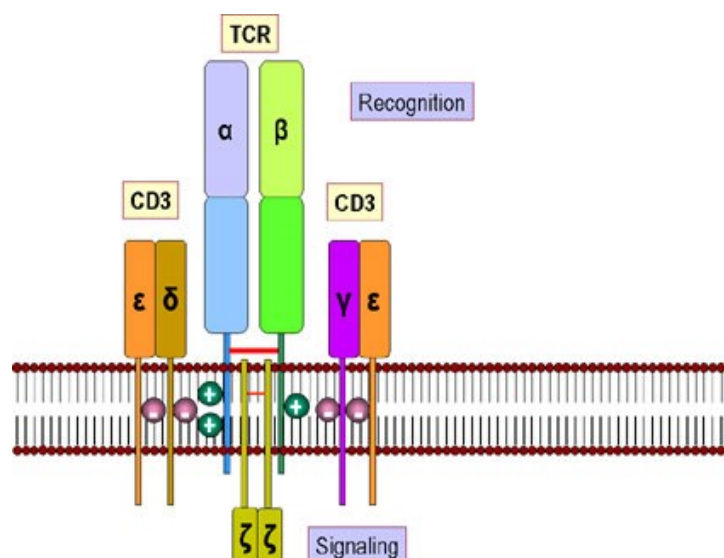


Figura 1.5: Rappresentazione del TCR e delle proteine accessorie CD3.

Alcune delle più importanti molecole accessorie che entrano in gioco nella risposta T sono [1,2]:

- CD3 (cluster of differentiation 3), proteine identiche in tutti i linfociti T, necessarie per la trasduzione del segnale dopo il riconoscimento dell'antigene da parte del TCR e per l'espressione di quest'ultimo sulla membrana della cellula T (figura 1.4).
- CD4 e CD8 (cluster of differentiation 4 e 8), proteine leganti regioni di molecole MHC che rafforzando l'adesione tra cellule APC e T, contribuiscono a trasdurre il segnale di attivazione.
- CD28 (cluster of differentiation 28), proteina di membrana che ha il compito di trasdurre i segnali in arrivo dal complesso TCR e di conseguenza attivare i linfociti T naive. Questi necessitano di due segnali extracellulari distinti per proliferare e differenziare: il primo deriva dal legame dell'antigene al recettore mentre il secondo viene fornito da molecole che vengono definite co-stimolatorie[14-16].
- CTLA-4, proteina che è strutturalmente omologa al CD28 ed è un secondo recettore per molecole B7. Essa viene espressa sui linfociti recentemente attivati e la sua funzione è inibire l'attivazione controbilanciando i segnali in arrivo dal complesso TCR e da CD28 [17].
- Integrine, molecole fondamentali per l'interazione tra cellule T e APC, in quanto in grado di favorire e stabilizzare la loro adesione.

FATTORI DI TRASCRIZIONE COINVOLTI NELLA RISPOSTA CD4

I fattori trascrizionali più importanti per quanto concerne sviluppo e attivazione dei linfociti T sono identificati in T-bet ed Eomes. T-bet è un fattore di trascrizione responsabile della differenziazione dei linfociti T in Th1 [18,19]. E' anche induttore della transizione da cellule effettrici a memoria; durante tale fase infatti, è visibile un calo nell'espressione di T-bet contemporaneo all'aumento di Eomes. Eomes è anche coinvolto nella differenziazione delle cellule T durante la risposta immunitaria regolando la produzione dell'IFN- γ e può essere visto come un fattore complementare all'azione di T-bet, in quanto è quasi identico a quest'ultimo nella regione T-box, facendo parte della stessa sottofamiglia di fattori. Altri due fattori trascrizionali cruciali per l'attivazione e proliferazione dei linfociti T sia CD4+ che CD8+ sono Blimp-1 e Bcl-6, antagonisti tra loro. Blimp-1 è un fattore codificato da Prdm1, attivato da IL-2 e correlato a funzioni effettrici e memoria in CD4+ e CD8+. Bcl-6 è un repressore trascrizionale del granzima B ed è coinvolto nella formazione di cellule T memoria CD4+ e CD8+[19-21].

Infine, Bcl-2 è una proteina associata alla permeabilità della membrana mitocondriale esterna e alla sua attività, controlla l'apoptosi e ha la funzione di prevenirla. Il gene Bcl-2 risulta essere coinvolto in numerose neoplasie e in malattie autoimmuni; livelli di trascrizione elevati di Bcl-2 riducono la propensione delle cellule ad andare incontro ad apoptosi. Bcl-2 potrebbe essere coinvolto nella sopravvivenza delle cellule T CD4+ follicolari.

CITOCHINE COINVOLTE NELLA RISPOSTA CD4

IL-2 è il gene codificante per l'omonima citochina infiammatoria, che è secreta da linfociti T attivati e agisce sia su linfociti T che B, ma anche su cellule quali fagociti mononucleati e cellule NK. La sua produzione avviene in seguito all'attivazione linfocitaria in risposta a infezioni o durante il processo infiammatorio. La produzione di IL-2 contribuisce alla maturazione della risposta immunitaria adattativa [22].

Un'altra citochina importante per regolare le cellule del sistema immunitario è il fattore di necrosi tumorale α (TNF α), il quale è coinvolto in processi come infiammazione, morte apoptotica cellulare, proliferazione e differenziamento.

Infine, IFN- γ è una citochina prodotta dalle cellule attivate che favorisce la differenziazione dei linfociti T CD4 in Th1 e viene prodotta in risposta allo stimolo di IL-12.

LINFOCITI B E ANTICORPI

I linfociti B sono le sole cellule in grado di sintetizzare molecole anticorpali. Queste cellule,

prima dell'attivazione, esprimono sulla loro superficie cellulare una forma di membrana dell'anticorpo che funziona come recettore per l'antigene del linfocita B. gli anticorpi sono distribuiti nei fluidi biologici dell'organismo e sono presenti sulla superficie di un numero limitato di tipi cellulari. Dopo l'esposizione all'antigene, le prime fasi della risposta anticorpale avvengono principalmente nei tessuti linfoidei, soprattutto nella milza e nei tessuti linfoidei associati alle mucose, mentre le plasmacellule, che producono anticorpi, persistono per tempi più lunghi in altri tessuti, come il midollo osseo. Gli anticorpi in forma secreta si accumulano nel plasma, nelle secrezioni mucosali e nel fluido interstiziale dei tessuti [1,2].

Un termine utilizzato frequentemente per identificare gli anticorpi è immunoglobuline (Ig), poiché gli anticorpi sono la frazione delle gammaglobuline che conferisce l'immunità.

Tutti gli anticorpi condividono le stesse caratteristiche strutturali di base, ma mostrano una notevole variabilità nelle regioni che legano l'antigene. Una molecola anticorpale ha una struttura simmetrica, composta da due catene leggere e da due pesanti identiche. Sia le catene pesanti che le leggere sono formate da una serie di unità omologhe ripetute che formano una struttura globulare definita dominio Ig.

Entrambe le catene, pesanti e leggere, presentano regioni variabili (V) amino-terminali, che partecipano al riconoscimento dell'antigene, e regioni costanti (C) carbossi-terminali; le regioni C delle catene pesanti sono responsabili delle funzioni effettrici degli anticorpi. Le regioni variabili sono così chiamate poiché contengono dei tratti nella sequenza amminoacidica che distinguono gli anticorpi prodotti da cloni diversi di linfociti B; la regione V di una catena pesante (V_H) si associa con la regione V di una catena leggera (V_L) a formare il sito di legame per l'antigene. Siccome ogni anticorpo ha due catene pesanti e due leggere, ogni anticorpo è dotato di due siti di legame per l'antigene. Le regioni costanti C delle catene pesanti, sono responsabili della maggior parte delle funzioni biologiche degli anticorpi, e del loro ancoraggio sulla membrana plasmatica dei linfociti B [1,2].

CLASSIFICAZIONE DELLE IMMUNOGLOBULINE

Gli anticorpi possono essere suddivisi in classi e sottoclassi sulla base di differenze presenti nella struttura delle regioni costanti delle catene pesanti. Le classi anticorpali prendono anche il nome di isotipi e sono denominate IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Tab.1). Nell'uomo le IgG e le IgA possono essere ulteriormente suddivise in altre sottoclassi. In generale per lo stesso isotipo anticorpale, le regioni C delle catene pesanti presentano circa la stessa sequenza amminoacidica [23].

Le diverse classi anticorpali svolgono funzioni effettrici diverse, proprio perché queste

funzioni sono mediate dalla regione C delle catene pesanti.

IgG

Sono le Ig presenti nel siero in maggiore quantità (75%) Le due catene H sono costituite da 4 domini (VH,CH1,CH2,CH3). Ci Sono 4 sottoclassi di IgG nel siero umano designate in base alla loro concentrazione decrescente IgG1,IgG2,IgG3,IgG4. Struttura primaria ($\gamma 1, \gamma 2, \gamma 3 \gamma 4$) con ampi tratti di omologia ma con differenze tra sottoclassi che incidono sull'emivita, fissazione del complemento, interazione con i recettori delle membrane di monociti e linfociti. Sono le uniche Ig che nella specie umana passano dalla madre al feto attraverso la placenta (difesa passiva nei primi mesi di vita) attivamente (riconoscimento specifico della regione Fc da parte delle cellule del trofoblasto).

IgA

Svolgono un ruolo di difesa soprattutto a livello delle mucose. Concentrazione relativamente bassa nel siero (IgA), prevalente invece nelle secrezioni (sIgA), (saliva, latte, secrezioni intestinali e bronchiali). Infatti, costituiscono il 10-15% delle Ig sieriche ma rappresentano invece la classe predominante nelle secrezioni (saliva, lacrime, secrezione nasale, succo gastroenterico, secrezioni ghiandolari). In questi sedi le IgA (IgA secretorie) sono presenti in forma polimerica consistendo di due monomeri, una molecola di congiunzione detta catena J e una glicoproteina chiamata frammento secretorio o FS. Esistono due sottoclassi di IgA: le IgA1 più rappresentate nel siero e le IgA2 più abbondanti nelle secrezioni.

IgM

La risposta primaria alla somministrazione di un antigene è sempre IgM. Sono presenti sulla membrana dei linfociti B; insieme alle IgD costituiscono le cosiddette Ig di membrana responsabili del primo riconoscimento dell'antigene. Mentre le IgM di membrana sono monomeriche, le IgM secrete nel siero sono dei pentameri costituiti da cinque sub unità monomeriche, ciascuna comprendente due catene μ e due L; l'unione delle subunità avviene mediante ponte disolfuro con l'intermezzo della catena J.

IgD

E' soprattutto una Ig di membrana; ha bassa concentrazione sierica. Estrema suscettibilità alla plasmina e ad altri enzimi proteolitici La sua presenza sulla membrana della maggior parte dei linfociti B, unitamente alle IgM, è prova di un suo ruolo di regolazione sulle prime fasi dell'immunità umorale.

IgE

Sono scarsamente rappresentate nel siero ma sono avidamente legate attraverso il loro

frammento Fc da vari tipi cellulari in particolare mastociti e basofili. La loro concentrazione a livello sierico aumenta durante fenomeni di ipersensibilità o di parassitosi.

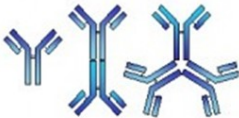




Immunoglobulina	Struttura	Luogo e Funzione
IgA		Nella saliva, nelle lacrime e nel muco di apparati digerente, respiratorio e genitale. Si lega ai microorganismi e li blocca.
IgD		Sui mastociti del tessuto connettivo e su alcuni globuli bianchi. Determina le risposte ai parassiti e le reazioni allergiche.
IgE		Sulle membrane plasmatiche dei linfociti B, coinvolta nelle reazioni allergiche.
IgG		Nel sangue, attiva il complemento e i macrofagi; nella placenta protegge il feto.
IgM		Nel sangue, agglutina gli antigeni e attiva le proteine del complemento, stimola la fagocitosi dei macrofagi.

Tabella 1.1: Isotipi anticorpali, struttura molecolare e funzione.

Le funzioni effettrici degli anticorpi sono innescate soltanto dagli anticorpi che hanno legato un antigene e non dagli anticorpi liberi.

Le modificazioni dell'isotipo degli anticorpi durante la risposta umorale condiziona il modo in cui verrà eliminato l'antigene durante la risposta stessa. Le cellule B vergini ad esempio, esprimono IgM e IgD, ma una volta attivate possono andare incontro a uno "switching" isotipico, in cui varia la regione C_H e la molecola esprime Ig più efficienti nel combattere

l'infezione, per esempio IgG nel caso di un'infezione di tipo virale o batterica.

Le regioni C_H sono importanti anche nel determinare la distribuzione tissutale degli anticorpi, in quanto durante l'attivazione le immunoglobuline perdono la loro caratteristica di adesione alla membrana e vengono secrete.

1.2 HIV

Il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è una delle maggiori piaghe nel mondo, per i nuovi casi di infezione, numero di persone infette e morte. Nel 2012 sono stati riportati nel mondo 2.3 milioni di nuovi casi di infezione da HIV (1.9-2.7 milioni) e 35,3 milioni di persone HIV positive [24].

Dal 1983, anno in cui è stato isolato il virus, HIV rappresenta un problema sociale, economico e sanitario.

Nonostante la massiccia diffusione della terapia antiretrovirale (ART) che ha enormemente prolungato la vita degli individui infettati da HIV e diminuito il numero delle nuove infezioni, per ogni 10 persone che entrano in terapia, ce ne sono 16 che contraggono l'infezione [25].

Ad oggi non esiste una strategia vincente per combattere l'HIV, e il crescente costo dei trattamenti diventerà un significativo problema soprattutto per i paesi in via di sviluppo. Sono necessarie strategie sia per eradicare il virus dall'organismo, sia per rinforzare le difese immunitarie degli individui colpiti, in modo da rendere la terapia antiretrovirale meno necessaria.

I danni più importanti causati dall'HIV si osservano a livello dell'immunità cellulare, e includono la deplezione dei linfociti T CD4+ e importanti disregolazioni sia dei CD4+ che dei CD8+ tra cui un calo di funzionalità [26,27], exhaustion [28], un aumento proliferativo dei linfociti T [29], la suscettibilità all'apoptosi [30,31] e l'espansione delle cellule memoria [32,33]. Questo stato di immunoattivazione cronica e di invecchiamento precoce del sistema immunitario coinvolge l'intero compartimento delle cellule T, comprese le cellule non infettate dal virus e cellule T non HIV-specifiche [34,35], è inoltre presente anche durante la terapia ART e contribuisce all'apparenza delle malattie opportunistiche AIDS e non-AIDS dipendenti [36].

1.2.1 CICLO REPLICATIVO DI HIV

Le particelle virali di HIV sono della grandezza di 100 nm ed hanno una struttura circolare che è costituita da un rivestimento esterno, l'envelope, una matrice e un capside. Quest'ultimo contiene il genoma, composto da due copie identiche di RNA a singolo filamento, che codifica per tre importanti geni chiamati gag, pol ed env e altri sei geni accessori che prendono i nomi di tat, rev, nef, vpr, vif e vpu (figura 1.6).

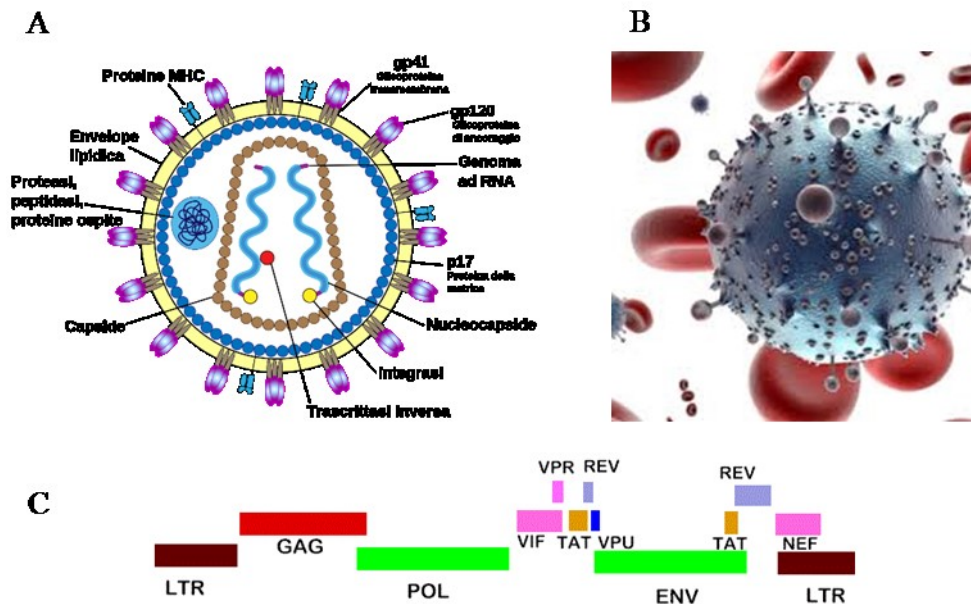


Figura 1.6. Particella del virus HIV-1. (A) Rappresentazione schematica della struttura della particella virale. (B) Immagine del virus. (C) genoma virale.

Il ciclo replicativo di HIV è un processo complesso che si realizza in più fasi ed inizia con l'interazione tra la proteina gp120, presente sull'envelope del virione, e la molecola CD4, espressa soprattutto su linfociti T, macrofagi e cellule DC; le successive interazioni con i recettori delle chemochine CXCR4 e CCR5 permettono la fusione del virus con la membrana cellulare e la seguente entrata del capside virale. I virus di HIV che usano il recettore della chemochina CXCR4 vengono denominati X4, mentre quelli che usano CCR5 sono denominati R5, infine quelli che li usano entrambi sono i R5X4 [37,38]. La fase seguente prevede la perdita del rivestimento del core e il rilascio di RNA virale nel citoplasma della cellula infettata, dove, attraverso l'azione della trascrittasi inversa, viene trascritto e convertito in un doppio filamento di DNA e integrato nel genoma dell'ospite. Una volta avvenuto tutto ciò, tale DNA può rimanere latente fino a quando la cellula ospite non viene attivata; se questo dovesse accadere il genoma virale verrebbe trascritto e sarebbero prodotte

le prime proteine Tat, Rev e Nef. Il DNA provirale è compreso tra due lunghe sequenze terminali ripetute (LTR); la sequenza 5' LTR include il promotore, un enhancer e una regione TAR (Trans-Activation Responsive). La proteina Tat lega TAR per stimolare la formazione di lunghi trascritti di RNA, che verranno poi tradotti in proteine precursori. Queste, dopo il taglio, comporranno le nuove particelle virali. La fase finale inizia con l'assemblaggio del core, che, migrando attraverso la superficie cellulare e la membrana plasmatica, contiene proteine strutturali del virus (figura 1.7). Il ciclo replicativo virale utilizza alcuni fattori di trascrizione dell'ospite e richiede l'attivazione della cellula infetta; infatti il virus infetta primariamente i linfociti T CD4+ attivati e i macrofagi, in quanto i CD4+ quiescenti posseggono dei fattori cellulari che limitano l'infezione da HIV-1 ed un ambiente cellulare che inibisce l'espressione virale.

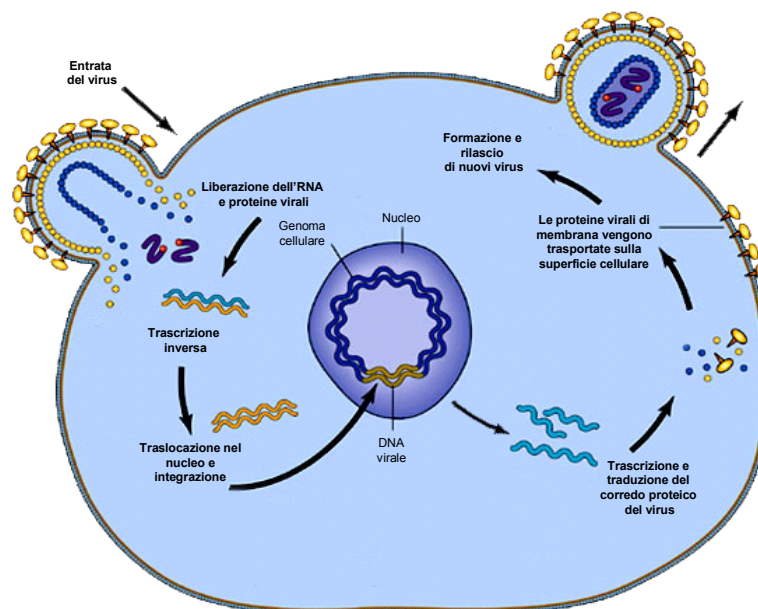


Figura 1.7. Rappresentazione del ciclo replicativo di HIV.

1.2.2 DISFUNZIONI IMMUNI INDOTTE DA HIV

I linfociti T CD4 interagiscono con altri tipi cellulari come cellule APC, linfociti B e CD8, quindi HIV, infettando preferenzialmente i primi, può andare ad influenzare le altre componenti dell'immunità adattativa. Il virus è in grado di danneggiare gli organi linfoidi e disregolare la maturazione e la differenziazione delle cellule T [39]: infatti l'infezione da HIV è caratterizzata da un decremento della componente naive e dall'espansione delle cellule T memoria [40], in particolare le effettrici [34,41]. I linfociti CD4 e CD8 mostrano inoltre diverse disfunzioni a livello delle componenti citolitiche [26,27], perdita di polifunzionalità [28,42], incremento della proliferazione [43,44], suscettibilità all'apoptosi

ed esaurimento [45,30]; il loro segnale intracellulare viene profondamente modificato assieme ai loro profili trascrizionali; in particolare è stato notato che nei linfociti CD8+ infetti si verifica un incremento dell'espressione di due fattori trascrizionali T-box, T-bet ed Eomes [46]. Tutti questi effetti provocati dall'infezione da parte di HIV sono il risultato di una diretta conseguenza dell'attivazione cronica e sistemica del sistema immunitario stesso. Le cause dell'attivazione cronica non sono state del tutto indagate, tuttavia i pazienti infettati da HIV dimostrano alti livelli di chemochine e citochine pro-infiammatorie che comportano un'iperattivazione delle cellule T, CD4+ e CD8+, e un incremento del ciclo replicativo virale. L'immunoattivazione cronica è caratterizzata da uno stato di persistente attivazione delle cellule del sistema immunitario dovuto all'espressione di markers di superficie e prodotti cellulari proinfiammatori e si misura con un'aumentata espressione di HLA-DR e CD38 sia sui linfociti CD4 che CD8. La funzione principale di HLA-DR è presentare i peptidi antigenici al sistema immunitario, mentre il CD38 è coinvolto nella trasmissione del calcio e la sua up-regolazione caratterizza non solo l'infezione da HIV ma anche mielomi e leucemie. L'aumentata espressione di queste due molecole è correlata con la progressione dell'infezione [47,48,49].

L'attivazione delle cellule T inoltre può essere provocata anche da eventi di coinfezione come con virus HCV, HSV-2, EBV, CMV e dalla distruzione delle barriere mucosali. Infine alcune proteine virali come gp120, Tat, Nef e Vpr sono note per favorire l'attivazione dei linfociti T [50,51].

1.2.3 LATENZA E RESERVOIR

Dopo la prima fase acuta e l'infezione primaria di HIV delle cellule target, il virus rimane al loro interno senza replicarsi attivamente fino alla sua riattivazione. È stato dimostrato che l'infezione da HIV sopravvive in un equilibrio dinamico tra un compartimento attivo e uno in latenza. Il virus si trova nello stato attivo nel sangue, nei linfociti e monociti, e in tali compartimenti è in grado di danneggiare il sistema immunitario; si trova nello stato di latenza in quelli che vengono chiamati *reservoir* dell'infezione, cioè macrofagi, cellule dendritiche e soprattutto linfociti T CD4+ con caratteristiche di cellule memoria [52]. Per *reservoir* virale si intende qualsiasi tipo cellulare o sito anatomico nel quale un virus replicativo competente persiste per tempo maggiore rispetto al pool di cellule infettate, garantendo la sopravvivenza dell'infezione. I *reservoir* latenti di HIV si stabiliscono precocemente durante l'infezione primaria e vengono identificati come la barriera maggiore all'eradicazione del virus, in quanto resistenti sia al sistema immunitario sia ai farmaci.

Genomi provirali integrati e cellule nelle quali HIV continua a replicarsi in presenza di HAART possono essere considerati *reservoir* virali e costituenti della latenza virale.

La maggior parte dei *reservoir* è costituita da cellule T CD4⁺ con fenotipo memoria sulla base delle loro caratteristiche di persistenza e riattivazione [53]. Secondo uno studio effettuato oltre il 50% dei *reservoir* è costituito da cellule T central memory, nelle quali il DNA di HIV risulta essere completamente integrato ma non in grado di produrre proteine virali attive. Tale tipologia cellulare risulta inoltre essere caratterizzata da bassi livelli di proliferazione e attivazione, costituendo i *reservoir* virali più stabili e con maggior emivita. I linfociti T CD4⁺ central memory sono comunque in grado di riattivarsi solo attraverso uno stimolo antigenico potente [52]. È stato recentemente dimostrato che la dimensione dei *reservoir* virali è associata all'espressione del fattore trascrizionale Blimp-1, in quanto alti livelli di tale fattore nelle cellule central memory determinano un decremento dei livelli di DNA di HIV e dei suoi livelli di mRNA; questo suggerisce che Blimp-1 potrebbe essere coinvolto direttamente nel controllo dei livelli di *reservoir* in cellule T CD4⁺ central memory [54].

Un'altra percentuale importante di *reservoir* è costituita dai linfociti T CD4 transitional memory, 34%, caratterizzati da un'integrazione parziale di DNA virale e livelli di proliferazione omeostatica, guidata da citochine fisiologiche proinfiammatorie come IL-7 e IL-15; sono meno stabili e maggiormente rappresentati in soggetti con livelli di immunoattivazione più alta, hanno emivita più breve [52]. La restante percentuale è costituita da cellule T effector memory (figura 1.8).

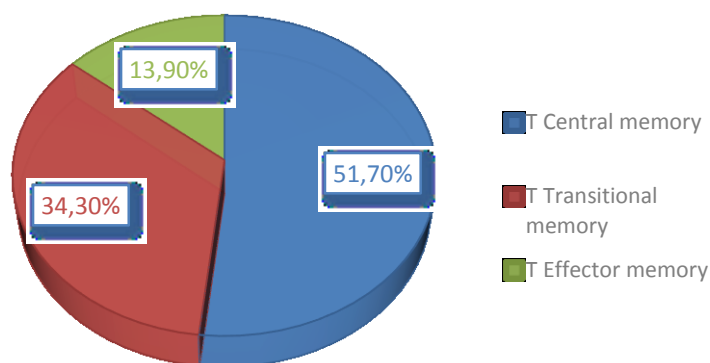


Figura 1.8: Percentuali di cellule costituenti i *reservoir* virali di HIV.

IL-7 ha un ruolo importante inoltre nel promuovere il mantenimento dei *reservoir* virali inducendo una proliferazione omeostatica delle cellule ospitanti il DNA del virus integrato,

mentre IL-15 induce proliferazione virale come conseguenza della differenziazione dei CD4 in cellule memoria [55].

1.2.4 LA PROTEINA TAT

STRUTTURA E FUNZIONE

Tat è una piccola proteina basica di 14 kDa [56], la cui sequenza amminoacidica varia da 86 a 101 aminoacidi, secondo il ceppo virale; è codificata da due esoni, di cui il primo, essenziale per la replicazione (aa 1-72), è altamente conservato, mentre il secondo presenta una maggior variabilità (aa 73-101). La funzione principale di Tat, prodotta precocemente dopo l'infezione, è di essere un *transattivatore trascrizionale*, ovvero potenzia la trascrizione del virus assicurando l'allungamento delle catene di RNA nascente, processo che altrimenti troverebbe molti ostacoli e darebbe origine a trascritti incompleti [57].

Tat appartiene ad una ristretta famiglia di proteine capaci di essere internalizzate dalle cellule in maniera recettore e temperatura indipendenti. Riesce a superare facilmente la membrana plasmatica e, grazie alla sua sequenza di localizzazione nucleare, si dirige al nucleo dove interagisce con il DNA. È in grado di modulare il segnale mediato dalle integrine, e in questo modo è direttamente coinvolta in molte funzioni delle cellule infette e non infette, indicando un ruolo diretto nello stabilimento e nel mantenimento dei *reservoir* virali.

Una volta arrivata al nucleo, Tat è in grado di regolare anche l'espressione di geni eterologhi [12]; per esempio, può stimolare l'espressione di citochine immunoregatorie, come TNF, IL-2 (anche se una parte del mondo scientifico riporta un effetto opposto su IL-2) o IL-6, la cui de-regolazione è correlata a molte patologie associate all'AIDS (come la psoriasi o il sarcoma di Kaposi). Inoltre Tat è in grado di indurre l'espressione di altri geni cellulari, come varie molecole di adesione, favorendo l'extra-vasazione delle cellule HIV-infette. Infine, Tat sembra anche essere coinvolta nella down-regolazione di molti geni coinvolti nella patogenesi di HIV, come l'oncosoppressore p53 (importante per limitare i tumori AIDS-associati), la manganese superossido dismutasi (utile per limitare lo stress ossidativo), l'IL-12 (stimolatrice delle cellule NK e della differenziazione dei linfociti Th1) e il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I e II (suggerendo una modalità del virus di eludere le difese immunitarie).

Le modulazioni dell'espressione genica possono ovviamente influenzare la patogenesi dell'AIDS e delle patologie correlate; in aggiunta, sembra che Tat sia in grado di attivare il

ciclo replicativo di alcuni virus AIDS-associati, oltre ad aumentare l'espressione genica del papilloma virus e del citomegalovirus.

L'azione di Tat sulla patogenesi non è legata solo all'attività di *transattivatore* (azione che, peraltro, si espleta anche sui genomi in latenza aumentando la quantità di virioni circolanti), ma alla sua funzione di *immunomodulatore*.

Tat è infatti in grado di rendere il sistema immunitario più suscettibile all'infezione, attivando le cellule T quiescenti (oltre a promuovere l'attivazione di cellule B e monociti) che, se rimanessero tali, non sarebbero adatte a divenire un target del virus e permettergli una efficiente replicazione [58].

L'attivazione linfocitaria ha come conseguenza anche un aumento nell'espressione, sulla superficie cellulare dei linfociti CD4⁺, dei co-recettori CCR5 e CXCR4, importanti per la penetrazione del virus.

La transattivazione sembra inoltre causare un effetto chemochina-simile, promuovendo la migrazione di molte popolazioni cellulari (monociti, cellule endoteliali, linfociti, oltre a vari tipi di linfoma) e favorendo quindi l'espansione dell'infezione.

ADIUVANZA E PROPRIETA' IMMUNOMODULATORIE DI TAT

Le cellule dendritiche (DC), insieme ai macrofagi e alle cellule B, sono cellule presentanti l'antigene professionali. Inizialmente presentano un'attività fagocitica, in quanto ingeriscono antigeni localizzati nei tessuti non linfoidi, per poi migrare nei linfonodi dove maturano e avviene la presentazione antigenica mediante molecole di MHC che permettono l'attivazione delle cellule T naive.

E' stato osservato che Tat riesce ad essere internalizzata dalle cellule dendritiche in maniera molto efficiente e, una volta entrata, modifica numerosi eventi cellulari, inducendo la maturazione delle DC stesse, potenziando la produzione e il rilascio di citochine immunomodulatorie e aumentando la presentazione dell'antigene. Questi effetti sottintendono, nel caso di vaccinazioni basate sull'utilizzo di Tat, un effetto adiuvante sulla maturazione delle DC con conseguente miglioramento della presentazione antigenica, compresa l'esposizione sulle molecole di MHC di peptidi derivati da Tat stessa [59].

A livello intracellulare, Tat sembra anche modulare espressione ed attività del proteasoma, ovvero di quel complesso enzimatico che gioca un ruolo importante nella degradazione delle proteine e nella conseguente generazione degli epitopi riconosciuti dai linfociti T citotossici. La proteina Tat, come è già stato descritto, esce nell'ambiente extracellulare dove esercita

numerosi effetti biologici simili a quelli indotti da un adiuvante [60]. E' stato dimostrato che Tat possiede proprietà auto-adiuvanti, in quanto è in grado di indurre una risposta anticorpale in diversi ceppi di topi in assenza di un altro adiuvante, previa la sua dimerizzazione.

E' stata dimostrata infine un'altra proprietà di Tat in grado di accreditarne la funzione di adiuvante, ovvero la capacità del dominio basico di incrementare l'espressione superficiale degli MHC di classe I [61]. Sperimentalmente, l'adiuvanza di Tat è stata dimostrata in topi vaccinati con Gag o Env in combinazione con Tat, i quali mostrano una risposta Th1 e CTL diretta verso un numero maggiore di epitopi rispetto a quelli vaccinati senza Tat [62].

EFFETTI DI TAT SUI LINFOCITI T, CD4+, CD8+ E CELLULE APC

Come descritto finora, Tat può entrare nelle cellule non infette per endocitosi, interagendo con i recettori delle integrine o legando gli eparan-solfati; a livello intracellulare Tat promuove l'attivazione delle cellule T, la proliferazione e favorisce l'espressione e il rilascio di citochine e chemochine.

Tat attiva i linfociti CD4+ portando ad un aumento delle secrezioni di IL-2, promuovendo l'infezione virale e aumentando la suscettibilità al virus stesso [63]. In aggiunta, Tat inibisce l'attività della SIRT1, una deacetilasi che fa parte della famiglia delle sirtuine, potenziando l'attività trascrizionale di NF- κ B [64] ed inducendo il rilascio di altre citochine coinvolte nella differenziazione e attivazione delle cellule T, come per esempio IL-8, IL-12 e TNF α . I linfociti T CD4+ supportano la generazione e il mantenimento delle classi di CD8+ effettrici e memoria, perciò è plausibile ritenere che gli effetti mediati da Tat sui primi possano riversarsi di conseguenza anche sulla risposta dei secondi, quindi sul controllo dell'infezione. Infatti, alcuni studi hanno anche confermato la diminuzione dell'espressione del CD127 nei linfociti T CD8+ di pazienti infetti da HIV, come risultato della stimolazione antigenica cronica e dell'interazione sinergica tra IL-7 e Tat [65,66] e il ruolo di tale proteina virale nel promuovere la produzione di IL-2 e IFN- γ nei linfociti T CD8+; infine essa influenza l'espressione dei fattori T-bet, Eomes e Blimp-1, che hanno funzioni effettrici, Bcl-6 ed Eomes, fattori importanti per lo sviluppo di funzioni memoria, e Bcl-2, importante per la sopravvivenza [67,68].

1.2.4 TERAPIE CONTRO HIV/AIDS

La diagnosi precoce di infezione è il primo passo per cercare di curare l'HIV, in quanto si stima che solo la metà della popolazione sieropositiva conosca il suo stato di progressione [69], e l'infezione da HIV non trattata porta il paziente alla morte in circa 10 anni. Dal 1987 ad oggi sono stati introdotti più di 20 farmaci antiretrovirali, rivolti verso tutti i meccanismi

virali riconosciuti come target farmacologico. Tra i farmaci in uso e quelli in sperimentazione si riconoscono: modulatori dell'espressione del recettore cellulare CD4; inibitori della fase di attacco del virus all'ospite; Antagonisti dei recettori delle chemochine; Inibitori della fusione cellulare, della trascrittasi inversa (nucleosidici, non nucleosiditi e nucleotidici); inibitori dell'integrasi, inibitori della trascrizione; inibitori della proteasi (PIs) e della ribonucleasi H. La combinazione di diversi farmaci antiretrovirali (HAART: terapia antiretrovirale altamente attiva) ha permesso l'evoluzione dell'infezione da HIV in una condizione cronica, la cui fatalità può essere evitata [70]. I risultati della HAART portano un iniziale aumento della conta CD4 + e la soppressione della carica virale [71], anche se pazienti HIV-positivi trattati mostrano aspettative di vita più brevi di coetanei non infetti, soprattutto quando si inizia la terapia in fase avanzata della malattia [72].

Nonostante gli importanti risultati raggiunti attraverso l'introduzione dei farmaci antiretrovirali (dimezzamento delle morti legate all'AIDS tra il 2005 e il 2011 [69]), diversi problemi riguardanti HAART rimangono irrisolti, come gli effetti collaterali, il momento giusto per iniziare, l'adesione permanente e quotidiana richiesta, l'indisponibilità di formulazioni pediatriche e la questione della resistenza ai farmaci [73]. Inoltre, gli effetti collaterali a lungo termine non sono noti, e soggetti HIV infetti mostrano, anche in presenza di HAART, un invecchiamento precoce [74]. I pazienti trattati mostrano risposte variabili alla terapia in termini di soppressione virale, risposta clinica e, soprattutto, risposta immunologica [75,76], infatti, è stato ampiamente dimostrato che HAART non ripristina del tutto le funzioni immuni [77,78,27].

Tuttavia, il problema maggiore nel trovare una cura contro HIV, è la sua eradicazione, cioè come gli attuali farmaci antiretrovirali non siano in grado di eliminare i serbatoi cellulari o reservoir [79]. Così, sforzi crescenti volti all'eliminazione dei reservoir virali hanno individuato alcuni approcci, ancora sperimentali, per integrare la terapia farmacologica con la riattivazione del virus HIV da cellule T CD4+ infette latenti direttamente, attraverso l'attivazione della trascrizione del DNA [80] o indirettamente attraverso la l'attivazione del compartimento delle cellule T [81]. Tuttavia, molti passi avanti devono ancora essere fatti per ottenere una cura definitiva per l'AIDS, e gli approcci farmacologici attuali devono essere potenziati e integrati con altre strategie.

PREVENZIONE

I farmaci antiretrovirali hanno dimostrato la loro importanza, non solo a livello individuale, ma anche dal punto di vista comunitario. Recenti studi sottolineano l'importanza di HAART come metodo di prevenzione: infatti, la soppressione di HIV impedisce la trasmissione del

virus dalle madri infette ai neonati (409 mila bambini infetti evitati 2009-2011 [69]) e in coppie sierodiscordanti [82]. Alcuni nuovi approcci che comprendono la somministrazione di farmaci antiretrovirali per le persone sane ad alto rischio di infezione sono stati proposti (profilassi pre-esposizione, PrEP), anche se con risultati discordanti [83,84]. L'attuazione della HAART e l'introduzione di PrEP per prevenire nuove infezioni sono questioni fortemente discusse oggi, perché fanno sorgere alcuni problemi etici come l'esposizione dei pazienti a periodi di trattamento più lunghi, con il rischio di aumento degli effetti collaterali, e il costo elevato portato dalla possibilità di trattamento precoce dei pazienti HIV positivi con la conta di CD4 al di sopra della soglia di 350 cellule / μ l.

In questo decennio, in molti paesi l'incidenza di HIV è diminuita anche più del 60% [69], ma nonostante questa tendenza, alcune regioni (Medio Oriente, Nord Africa, Europa orientale e Asia centrale) soffrono ancora per un aumento di persone contagiate. I migliori risultati nel campo della riduzione dell'incidenza sono stati osservati in questi paesi mettendo molto impegno in programmi di prevenzione e di trattamento [69]. In effetti, il modo migliore per prevenire le infezioni da HIV è, oggi, attraverso l'educazione e la sensibilizzazione. Fattori come la disuguaglianza di genere o il sottosviluppo economico e sociale possono avere ripercussioni negative sull'educazione sessuale o su un comportamento sessuale sicuro [84]. Quindi, se il ruolo chiave del sesso sicuro e di pratiche come la circoncisione sono già stati dimostrati, molti sono gli sforzi indirizzati per lo sviluppo di altri approcci di prevenzione complementari, come la vaccinazione.

RICERCA DI UN VACCINO

Alcuni pazienti sieropositivi possono controllare naturalmente l'infezione da HIV in assenza di qualsiasi terapia. Essi sono chiamati "long terminal non progressors" (LTNP), per la bassa carica virale e il lento declino del numero di CD4 +; tra questi, quelli che mantengono una viremia non rilevabile per anni sono chiamati "elite controllers" (EC) [85]. Questo gruppo di pazienti è stato ampiamente studiato per determinare correlati di protezione che possono essere importanti nello sviluppo di strategie di vaccinazione, anche se spesso le cause del controllo virale sono fattori genetici propri del paziente stesso [86,87].

Linfociti T CD8 + sembrano giocare un ruolo chiave nel controllo dell'infezione da HIV, così come il rilevamento di CTL HIV-specifici coincide con una diminuzione della carica virale [88], e alcuni alleli HLA di classe I sono associati con il controllo dell'infezione [89]. La qualità della risposta CD8+, più che la quantità, contribuisce al controllo virale: infatti, CTL HIV-specifici dal display virale aumentano la polifunzionalità [90], la capacità proliferativa e l'attività antivirale [91]. È interessante notare che, alleli protettivi bersaglio di

epitopi mostrano CTL con mutazioni per la fuga con costi elevati per il ciclo vitale virale [92]. In realtà, l'HIV muta epitopi dominanti [93] per evitare l'immunità cellulare e risposte CTL protettive per fare pressione sulle mutazioni che provocano una perdita di competenza di replicazione. Questo processo dinamico porta anche a continui cambiamenti del virus e, pertanto, allo sviluppo di virus geneticamente diversi nel singolo individuo [92,94]. Per quanto riguarda l'immunità antigene mirata, risposte anti-Gag correlano con bassa viremia, mentre le risposte anti-Env sono più frequenti nei pazienti con alta carica virale [95]. Inoltre, l'ampiezza delle risposte anti-Gag, soprattutto se diretta a due regioni di Gag (Gag 1-75 e Gag 248-500), sembra essere un correlato di protezione [89,95].

Anche le risposte umorali hanno dimostrato di indurre mutazioni [96]. Tuttavia, se la risposta CTL sembra indurre anticorpi protettivi per il controllo dell'infezione da HIV, gli anticorpi neutralizzanti (nAbs), la cui produzione richiede elevata carica virale, e la loro potenza e ampiezza non sembrano corrispondere con il correlato di protezione degli EC [97]. La recente scoperta che gli nAbs siano in grado di conferire una grande risposta contro i virus in circolazione [98] ha rafforzato il concetto che l'induzione della risposta umorale sia importante più per la prevenzione dell'infezione da HIV che per i vaccini terapeutici. Tuttavia, Abs possono agire attraverso diversi meccanismi, come citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC), importante per il controllo virale [99,100]. I trials del primo vaccino si basavano su questo concetto, allo scopo di indurre Abs contro proteine dell'involucro. Tuttavia, non sono riusciti a indurre la protezione contro l'acquisizione dell'infezione [101]. Quindi, il mondo scientifico ha spostato l'attenzione verso candidati vaccinali in grado di indurre la risposta cellulare, ma, ancora una volta, i risultati non sono stati promettenti, e il processo è stato fermato per un aumento del rischio di acquisizione di HIV in soggetti vaccinati [102], a causa di una certa immunità pre-esistente del vettore virale utilizzato, e una polarizzazione inadeguata di risposte CTL verso epitopi meno conservati [103].

Il terzo candidato vaccinale che ha finito il trials di fase 3 è stato RV144, che ha mostrato circa il 30% di protezione contro l'acquisizione di HIV ma senza effetti sul controllo del virus dopo l'infezione [104]. Il trial, condotto in Thailandia, consisteva in un prime con un canarypox che esprime Gag, Pro e gp120 e un boost con gp120 [104]. Gli studi sulle correlazioni di analisi dimostrano che, mentre IgG plasmatiche anti-v1v2 (regioni variabili della gp120) correlano con una diminuzione del rischio di infezione tra vaccinati e non vaccinati, IgA plasmatiche anti-Env correlano con un controllo minore dell'infezione interferendo con la capacità del vaccino di diminuire l'infezione da HIV. Questi dati portano

a chiedersi se i diversi isotipi anticorpali influenzino il livello di efficacia del vaccino [105]. Il meccanismo dietro l'interferenza delle IgA con l'immunità protettiva non è stato chiarito; tuttavia, alcune analisi suggeriscono che le IgA possano interferire con differenti meccanismi protettivi forniti dalle IgG, attraverso il legame allo stesso sito utilizzato dalle IgG [105].

Lo sviluppo di vaccini contro l'HIV è importante, oltre che per prevenire l'infezione da HIV, anche per controllare la replicazione virale e la progressione della malattia in individui già infetti, con l'obiettivo di scoprire vaccini terapeutici che possano sostituire HAART. Tuttavia, ad oggi nessun candidato vaccinale ha dimostrato di essere altamente immunogenico e, allo stesso tempo, conferire protezione dalla riattivazione virale dopo l'interruzione della HAART [106,107].

Così, la ricerca sui vaccini preventivi e terapeutici contro l'HIV è ancora in corso, e rappresenta molti candidati sono sottoposti a diverse fasi di prova.

TAT COME CANDIDATO VACCINALE

Tat svolge un ruolo chiave nel ciclo di vita di HIV, nella progressione verso l'AIDS e immunità umorale e cellulare anti-Tat costituiscono un correlato di protezione. Pertanto, l'inclusione di Tat come antigene in vaccini preventivi e terapeutici contro l'HIV è stata valutata da diversi gruppi.

Coerentemente con i ruoli di Tat nella patogenesi dell'HIV e la sua produzione precoce dopo l'infezione, IgM e IgG anti-Tat sono più frequenti nella fase asintomatica dell'infezione [108, 109]. IgG anti anti-Tat sono presenti in una piccola percentuale di individui affetti da HIV, ma si trovano più spesso nei non progressors [110]. Infatti, diversi lavori descrivono la protezione conferita dalle IgG anti-Tat dal calo dei CD4 + [111, 112], dall'alta carica virale o dalla p24 antigenemia [250, 251] e dalla progressione della malattia [110,113,114].

Inoltre, le risposte CTL contro le proteine di HIV che sono prodotte nelle prime fasi dell'infezione sono di particolare importanza per il controllo virale, e ciò è evidenziato dal rilevamento di Tat-CTL mutati a tempi brevi dopo l'infezione [115,116]. Inoltre, ci sono prove che la presenza di anticorpi anti-Tat CTL correla con la non-progressione in soggetti HIV-positivi [117]. La regione N-terminale, la regione di nucleo e il dominio di base Tat contengono la maggior parte degli epitopi delle cellule T, come pure di cellule B, [118,119].

L'immunizzazione con Tat in diversi modelli animali ha generato risposte anticorpali in grado di bloccare l'ingresso di Tat nelle cellule e i suoi effetti su progressione e replicazione

virale [120]. Inoltre, scimmie vaccinate con Tat hanno mostrato livelli di viremia non rilevabili e impedito il calo della conta CD4+ dopo infezione con virus Shiv, suggerendo un'infezione abortiva [121,122]. Inoltre, nei macachi vaccinati con Tat e infettati con Shiv, è stata osservata una protezione a lungo termine, l'assenza di serbatoi virali e di replicazione del virus, ed entrambe alle risposte anti-Tat, umorale e cellulare, sono state responsabili di questo effetto [123,124]. Questi risultati, insieme con i dati di sicurezza e immunogenicità raccolti in diversi modelli animali [155,120], hanno sostenuto lo sviluppo di un vaccino basato sulla proteina Tat.

Una fase preventiva e uno studio di fase I terapeutico sono stati condotti in parallelo con la proteina Tat di HIV-1 ricombinante biologicamente attiva (86aa) per valutarne la sicurezza e l'immunogenicità [125,126]. Dopo il perseguimento degli end-point, il vaccino basato su Tat la sperimentazione terapeutica di fase II in Italia e in Sud Africa. I risultati di un'analisi esplorativa su 87 individui sieropositivi trattati con HAART che ricevono il vaccino con Tat in studio di fase II è stato pubblicato nel 2010 [127]. L'immunizzazione con Tat inverte i segnali di attivazione immunitaria diminuendo i livelli di markers cellulari e solubili di attivazione immunitaria e ipergammaglobulinemia. Da segnalare, il ripristino delle funzioni immunitarie dopo l'immunizzazione è stato confermato dalla reversione della perdita delle cellule T CD4+ e dei linfociti B negli individui Tat-immunizzati, nonché da maggiori risposte cellulari contro HIV e gli antigeni di richiamo eterologhi [127].

Un secondo vaccino basato sulla proteina Tat, che utilizza una variante di Tat isolata da un gruppo di controllori di pazienti africani (Tat Oyi) [128] è entrato in fase I di sperimentazione clinica in Francia nel 2013.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo studio è la comprensione del ruolo della proteina Tat nell'aumentare i target virali di infezione (2.1) e nel favorire la latenza di HIV (2.2). Inoltre è stato valutato, in vivo, l'impatto di diverse vie di somministrazione nel generare una risposta umorale anti-Tat efficiente, confrontando l'immunogenicità della proteina intera con quella del peptide Tat 1-20 (2.3).

2.1 IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO DELLA PROTEINA TAT NELL'INFEZIONE DA HIV

Il livello di attivazione e maturazione dei linfociti T CD4+ è molto importante nel determinare l'infezione da HIV: è noto infatti che i linfociti T CD4+ attivati sono il target preferenziale del virus, ne consegue che qualsiasi fattore, comprese le proteine virali, in grado di attivare le cellule può contribuire ad aumentare le possibilità di infezione e la progressione della malattia. La proteina Tat di HIV induce segnali integrina-mediati ed entra efficacemente nelle cellule, attivandole e modulandone diverse funzioni. Questo, nei linfociti T CD4+, potrebbe avere conseguenze dirette sull'aumento dello spread virale tramite la generazione di nuovi linfociti T CD4+ attivati, target di infezione. Studi recenti hanno inoltre evidenziato la capacità di Tat di modificare il profilo trascrizionale e la differenziazione dei linfociti T CD8+[67]. Per caratterizzare gli effetti diretti di Tat sull'attivazione dei linfociti T CD4+ sono state messe in coltura cellule CD4+ isolate da sangue di donatori sani e sono stati analizzati: aspetti di attivazione funzionale, come il rilascio di citochine e la proliferazione cellulare; il fenotipo, utilizzando marker caratteristici di attivazione cellulare; il profilo trascrizionale di geni importanti nel differenziamento dei linfociti T CD4+. Tutte queste analisi sperimentali sono state svolte sia su linfociti T CD4+ in assenza di stimoli, che su linfociti stimolati con anti CD3/CD28. La comprensione degli effetti di Tat sull'attivazione dei linfociti T CD4+ potrebbe chiarire il suo ruolo nel favorire l'infezione virale.

2.2 IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO DELLA PROTEINA TAT NELLA GENERAZIONE E NEL MANTENIMENTO DEI RESERVOIR VIRALI

I linfociti T CD4+, transitional memory e central memory, costituiscono la maggior parte dei *reservoir* virali di HIV. Qualsiasi fattore in grado di favorire la generazione e il

mantenimento di queste sottopopolazioni di cellule, gioca un ruolo importante nel favorire la sopravvivenza del virus all'interno dell'organismo, favorendone la latenza. Per valutare l'effetto di Tat sul differenziamento dei linfociti T CD4⁺ verso cellule con caratteristiche di memoria, quindi *reservoir* di HIV, è stato prima di tutto analizzato l'effetto della proteina sul fenotipo, andando a valutare marker indicatori di cellule memoria come CD62L, CD44, CCR7, CD45RA e CD127. Successivamente, per valutare l'effetto di Tat su differenziazione e mantenimento di linfociti T CD4⁺ memoria, è stato messo a punto un modello cellulare *in vitro* in grado di generare e mantenere in coltura linfociti T CD4⁺ central memory, utilizzando come cellule di partenza CD4⁺ naive ed effettori, stimolati in condizioni di “non polarizzazione”. Sono stati valutati la vitalità delle cellule in coltura e il fenotipo dei linfociti T CD4⁺, analizzando le sottopopolazioni central memory, transitional memory ed effector memory. A questo punto è stato valutato l'effetto della proteina Tat sulla generazione, la vitalità e mantenimento dei linfociti T central memory ottenuti attraverso il trattamento di “non polarizzazione”. Questo studio è volto all'identificazione del ruolo della proteina Tat nel favorire la generazione e il mantenimento dei *reservoir* virali, che ad oggi sono uno dei maggiori ostacoli all'eradicazione dell'HIV dall'organismo.

2.3 VALUTAZIONE PRECLINICA DELL'IMMUNOGENICITA' DELLA PROTEINA TAT E DEL PEPTIDE TAT 1-20

La proteina Tat è attualmente utilizzata in vaccini sia preventivi che terapeutici da diversi gruppi di ricerca, che hanno mostrato risultati promettenti nei primati [143,135] e nei trials clinici di fase I e II [135,127]. Inoltre, è stato dimostrato che anticorpi diretti contro la regione N-terminale di Tat, che è la più immunogenica in termini di risposta umorale [119,131], proteggono le scimmie dall'infezione, suggerendo che il peptide di Tat 1-20 possa essere un candidato interessante per lo sviluppo di un vaccino preventivo.

Le problematiche legate allo sviluppo di un vaccino efficace sono in parte dovute anche alla compliance vaccinale e alla via di somministrazione utilizzata. L'obiettivo di questa parte dello studio è stato quindi quello di caratterizzare l'impatto della via di somministrazione nel generare una risposta anticorpale anti- Tat e anti- Tat 1-20 efficiente. Per caratterizzare l'incidenza della via di somministrazione nell'indurre una risposta umorale a livello sia sistemico che mucosale, sono state paragonate le immunizzazioni per via intradermica, intramuscolo e attraverso la mucosa orale sia della proteina Tat che del suo peptide immunodominante Tat 1-20, in assenza di adiuvante. Le analisi sono state condotte utilizzando un modello *in vivo* di topi Balb/C, immunizzati tre volte con la proteina Tat. I titoli e gli isotipi anticorpali anti Tat sono stati valutati nel siero e nei lavaggi mucosali

tramite test Elisa. Il protocollo sperimentale è stato ripetuto immunizzando per via intradermica e attraverso la mucosa orale con il peptide Tat 1-20, e sono stati valutati, sempre tramite test Elisa, i titoli e gli isotipi anticorpali anti- Tat 1-20. In quest'ultima parte dello studio sono state quindi indagate le proprietà immunogeniche di Tat, studiando nuove vie di somministrazione potenzialmente in grado di fornire risposte umorali efficienti anche a livello mucosale, e con possibilità di rendere la somministrazione del vaccino più semplice e ugualmente sicura e ben tollerata.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ANALISI IN VITRO

3.1.1 PROTEINA TAT

La proteina Tat di HIV-1 clade B, utilizzata negli esperimenti in vitro, è stata prodotta in *E. coli* e purificata da DIATHEVA [129]. Per l'utilizzo, la proteina liofilizzata e conservata a -80° viene risospesa in PBS con 0.1% di BSA.

3.1.2 LINFOCITI DAL SANGUE PERIFERICO

I linfociti dal sangue periferico (PBL, peripheral blood lymphocytes) vengono ottenuti da sangue di donatori sani (buffycoat) fornito dalla Banca del Sangue di Ferrara, tramite stratificazione su Ficoll. In seguito a centrifugazione a 2000 rpm per 20 minuti, si ottiene un pellet costituito da neutrofili e globuli rossi, un anello di linfociti e monociti (Peripheral Blood Mononucleate Cells, PBMC), e plasma. Si aspira l'anello centrale di PBMC, e si lava con Phosphate Buffer Solution (PBS) sterile a 1700rpm per 10 minuti; le cellule si mettono in adesione in fiasca per 90 minuti a 37°C. I monociti restano in adesione e si prelevano i linfociti che vengono centrifugati e risospesi in terreno RPMI+ 10% FCS.

3.1.3 PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI T

PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI T CD4+

Per la purificazione dei linfociti T CD4+ è stato utilizzato il CD4+ T Cell Isolation Kit II human (Miltenyi Biotec), che isola i CD4+ tramite selezione negativa. I PBL vengono contati e il quantitativo desiderato (150 milioni) viene risospeso in falcon con circa 8 ml di Buffer (PBS a pH 7,2 0,5% Bovine Serum Albumine, e 2mM di EDTA). Si procede con un lavaggio a 1700 rpm per 10 minuti. Si risospende il pellet in 40µl di Buffer per 10 milioni di cellule e si aggiungono 10 µl di Biotin-Antibody Cocktail. Si lascia la sospensione cellulare a 4° C per 10 minuti. Successivamente si aggiungono 30µl di Buffer e 20µl di Anti-Biotin Micro Beads per ogni 10 milioni di cellule. Si lascia in incubazione per 15 minuti a 4° C. Si procede lavando con Buffer con una quantità circa 30 volte superiore al volume in falcon a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet ottenuto viene risospeso in 500µl di Buffer. Giunti a questo punto si effettua la separazione su colonna. Si posiziona il magnete sul supporto e si inserisce la colonna LS di eluizione. L'eluato viene raccolto in una falcon da 15 ml. Il primo step prevede l'idratazione della colonna con 3 ml di Buffer per poi introdurre la sospensione

cellulare. Conclusa l'eluizione delle cellule si procede lavando nuovamente con 3 ml di Buffer per 3 volte la colonna. Si lava la sospensione ottenuta dall'eluizione a 1200 rpm per 6 minuti, ed il pellet ottenuto lo si risospende nel volume di terreno desiderato.

L'efficienza della purificazione è stata controllata al citofluorimetro colorando le cellule con l'anticorpo anti CD4 FITC (Immunotools).

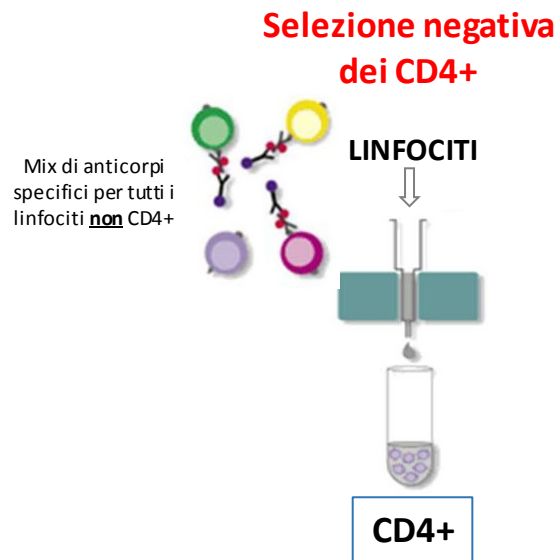


Figura 3.1: Rappresentazione della purificazione attraverso biglie magnetiche dei linfociti T CD4+ per selezione negativa a partire da linfociti totali.

PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI T CD4+ NAIVE

Per la purificazione dei linfociti T CD4+ Naive è stato utilizzato il Naive CD4+T Cell isolation kit II, Human (Miltenyi Biotec) che isola i CD4 tramite selezione negativa. Vengono contati circa 200 milioni di PBL e risospesi in falcon in 4 ml di Buffer (PBS pH 7,2; 0,5% Bovine Serum Albumine; 2mM di EDTA). Per avere una sospensione cellulare mono dispersa si utilizza un filcon da 50µm precedentemente avvinato con 1ml dello stesso Buffer. Si lavano le cellule a 1700 rpm per 10 minuti e il pellet ottenuto è risospeso in 600µl di Buffer. Successivamente si aggiungono 150µl di Naive CD4 T cell biotin-antibody cocktail II e si incuba a 4°C per 5 minuti. Al termine dell'incubazione si aggiungono 450µl di Buffer e 300µl di Naive CD4 T cell microbead Cocktail II, si incuba a 4°C per 10 minuti. A questo punto si procede con la separazione su colonna. L'eluato viene raccolto in falcon. A seguito dell'eluizione delle cellule si lava la colonna con 3 ml di Buffer Miltenyi per 3 volte. Si procede lavando l'eluato e il liquido di lavaggio a 1200rpm per 6 minuti, si contano le cellule e si piastrano alla concentrazione di 2 milioni/ml di terreno RPMI +10 % FCS.

Il fenotipo delle popolazioni ottenute viene verificato tramite analisi citofluorimetrica al FACSscan (Beckton Dickinson).

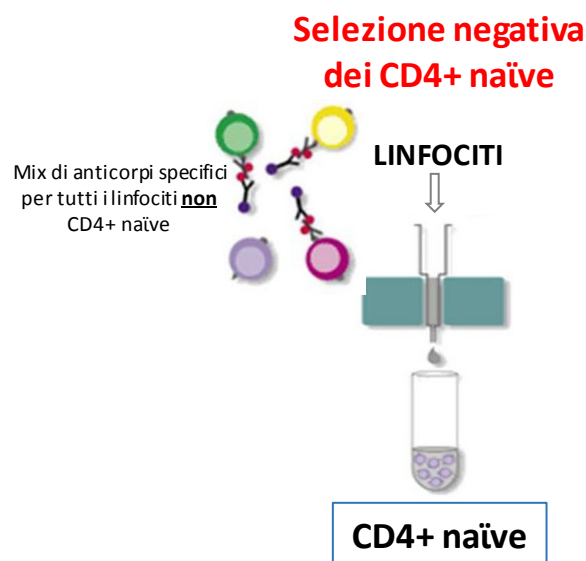


Figura 3.2: Rappresentazione della purificazione attraverso biglie magnetiche dei linfociti T CD4+ naïve.

PURIFICAZIONE DEI LINFOCITI T CD4+ CENTRAL MEMORY (TCM)

Per la purificazione dei linfociti T CD4+ Tcm è stato utilizzato il CD4+ Central Memory T Cell Isolation Kit Human (Miltenyi Biotec), tramite selezione prima negativa e poi positiva. I PBL vengono contati, e il quantitativo desiderato (150 milioni) viene risospeso in falcon con circa 4 ml di Buffer (PBS pH 7,2; 0,5% Bovine Serum Albumine; 2mM di EDTA) previa filtrazione con filcon da 50µm. Si lava la sospensione di cellule ottenuta a 1200 rpm per 6 minuti. Il pellet in seguito viene risospeso in 200 µl di Buffer per 50 milioni di cellule. Si aggiungono 50 µl di CD4+ Central Memory cell biotin-antibody cocktail e si incuba a 4°C per 10 minuti. Successivamente si aggiungono 150 µl di Buffer e 100 µl di Anti-biotin microbeads e si incuba a 4° C per 15 minuti. Si procede aggiungendo 5 ml di Buffer e lavando a 1200 rpm per 6 minuti. Il pellet viene risospeso in 1ml di Buffer. A questo punto si effettua la prima separazione con colonna tramite selezione negativa (come descritto precedentemente). Si procede lavando l'eluato a 1200rpm per 6 minuti. Il pellet ottenuto è risospeso in 50µl di Buffer. Si aggiungono 50µl di CCR7 (CD197) PE, si incuba a 4°C per 10 minuti. Successivamente si aggiunge 1 ml di Buffer e si lava a 1200 rpm per 6 minuti. Il pellet viene risospeso in 50 µl di Anti PE microbeads e si incuba a 4°C per 15 minuti. Si effettua un ulteriore lavaggio con 1 ml di Buffer a 1200 rpm per 6 minuti. Infine si risospende il pellet in 500ul di Buffer. Si può quindi procedere con la seconda separazione su colonna tramite selezione positiva. La colonna viene prima inizialmente idratata con 500µl di Buffer, in seguito si aggiungono i 500 µl di sospensione cellulare. A seguito dell'eluizione si lava la

colonna con 500 µl di Buffer e si ripete quest'ultimo passaggio per 3 volte. L'eluito ottenuto conterrà CD4+ depleti di linfociti T Naive e Central Memory. Per ottenere infine la sottopopolazione Central Memory si procede staccando la colonna dal magnete e lavando la colonna con 2 ml di Buffer spinto a pressione con l'apposito stantuffo. Come ultimo passaggio si lava a 1200 rpm per 6 minuti e le cellule sono riospese alla concentrazione di 2 milioni cellule/ml RPMI+10%FCS.

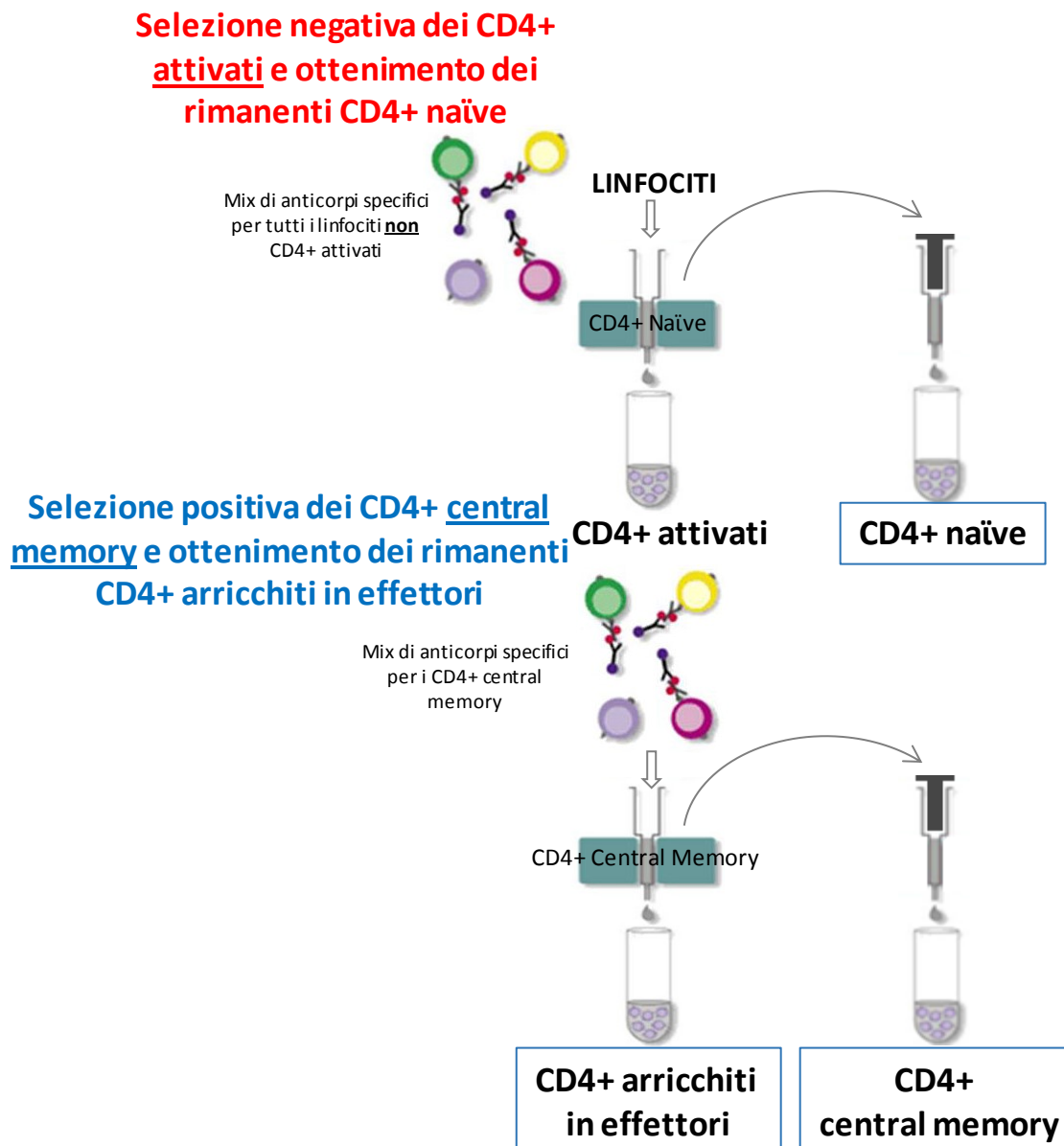


Figura 3.3: Rappresentazione della purificazione attraverso biglie magnetiche dei linfociti CD4+T arricchiti in effettori a partire da linfociti totali.

Anche in questo caso il fenotipo delle popolazioni ottenute viene verificato tramite analisi citofluorimetrica al FACScan (Beckton Dickinson).

3.1.4 STIMOLAZIONE DELLE CELLULE T

Le cellule sono state trattate, in presenza od assenza di Tat, sia in condizioni quiescenti (*resting*) che di attivazione. Le condizioni *resting* sono state ottenute piastrando 2.000.000 di cellule in 2 ml di RPMI +10% FCS in piastra da 24 pozzetti. Invece, l'attivazione linfocitaria in piastra è stata condotta usando anticorpi anti-CD3 (Bioscience) e anticorpi anti-CD28 (Bioscience). Le madri sono state risospese in PBS sterile alle concentrazioni di 3 µg/ µl per l'anti-CD3 e 0,2 µg/ µl per l'anti-CD28. I pozzetti sono stati pre adsorbiti per 16 ore con l'anti-CD3, 1µg/well, mentre l'anti-CD28 (0,2 µg/pozzetto) è stato aggiunto subito dopo la piastratura delle cellule.

Infine, nei pozzetti che prevedono il trattamento con la proteina Tat, vengono aggiunti 0,5µl di Tat ricombinante (Diatheva) per ml. Prima del suo utilizzo, Tat viene ricostituito in PBS + 0,1 % BSA (Bovine Serum Albumin), mantenuto al riparo da luce e calore, tutto il materiale plastico è stato avvinato con lo stesso tampone in cui è risospesa la proteina Tat.

I tempi di trattamento sono stati di 6h e 18h per l'analisi del rilascio di citochine, di 24h, 7, 14 e 20 giorni per l'analisi fenotipica e di 4h e 24h per l'analisi del profilo trascrizionale.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE E TIME_LINE PER LA CONDIZIONE DI “NON POLARIZZAZIONE”

Il protocollo sperimentale è mostrato in figura 10 e prevede la piastratura (in piastra da 24 pozzetti) a 4° C dell'anticorpo anti-CD3 (Bioscience) per l'attivazione linfocitaria. 24 h prima della separazione del buffycoat. Il giorno seguente è necessaria la rimozione della soluzione di anticorpo prima della piastratura delle cellule.

Al giorno 1 viene effettuata la piastratura di 2 milioni di linfociti T CD4+/ T CD4+Naive/T CD4+ depleti di Naive e Central Memory nei pozzetti nei quali è stato precedentemente effettuato il coating con anti-CD3 e la loro successiva stimolazione con i trattamenti previsti. Le cellule sono state contate ogni 3 giorni e stimolate con 0,6µg/ml di Interleuchina-2 (IL-2) per consentirne la proliferazione e il mantenimento. Ai giorni 7, 14 e 20 è stata effettuata l'analisi fenotipica mediante FACScan, per verificare la differenziazione cellulare dalla popolazione di linfociti T CD4 di partenza (T CD4+/ T CD4+Naive/T CD4+ depleti di Naive e Central Memory) a Central Memory(Tcm), Transitional Memory (Ttm) ed Effector Memory (Tem). (Tcm), Transitional Memory (Ttm) ed Effector Memory (Tem).

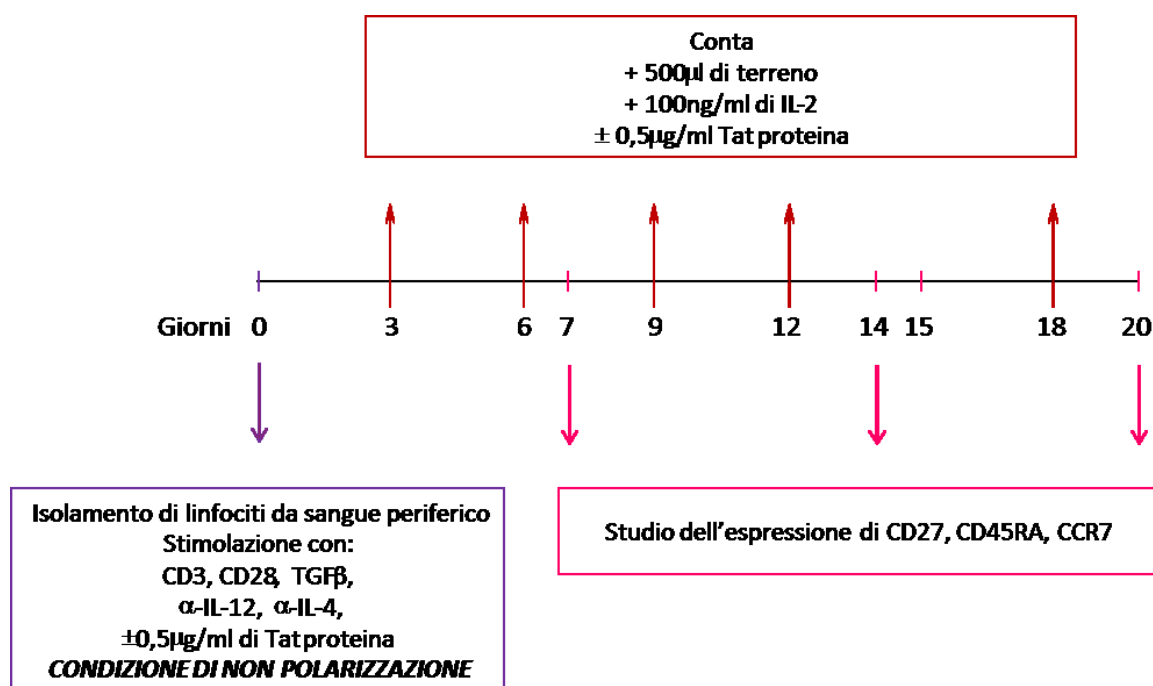


Figura 3.4: Time line protocollo di stimolazione in condizioni di non polarizzazione.

Il termine “non polarizzato” indica una particolare sottopopolazione di linfociti T con livelli di differenziazione intermedi tra le cellule naive ed effettrici. Le cellule non-polarizzate sono considerate in vitro l’equivalente delle cellule T central memory in circolo. La condizione di non polarizzazione viene riprodotta in vitro stimolando le cellule piastrate nei pozzetti in cui era stato fatto aderire l’anticorpo anti-CD3 con l’aggiunta di 100ng/ml di anticorpo anti-CD28, 10ng/ml di Trasforming Grow Factor 1 (TGFβ-1), 1µg/ml di anti Interleuchina-4 (per eliminare la differenziazione in Th1), 2ng/ml di anti Interleuchina 12 (per eliminare la differenziazione in Th2). Secondo protocollo sperimentale, nei pozzetti in cui previsto sono state aggiunte quantità operative di Tat B Reserch Grade, ricostituita con PBS + 0,1% BSA (Bovine Serum Albumin) alla concentrazione di 0,5µg/µl. Lo stimolo è stato aggiunto ogni 3 giorni di coltura³⁵⁻³⁷.

3.1.5 ESTRAZIONE RNA MESSAGGERO

Dopo il tempo previsto per il trattamento, le cellule vengono lavate in PBS ed il pellet congelato in 500 µl di Trizol (Sigma-Aldrich). I campioni vengono scongelati e lasciati 5 minuti a temperatura ambiente. In ogni campione si aggiungono poi 100 µl di CH₃Cl, si agita, si lascia per 10 minuti a temperatura ambiente e poi si centrifuga a 12000 g per 15 minuti a 4°C. Si trasferisce la fase acquosa superiore, che contiene RNA, in una nuova eppendorf, e per ogni campione si aggiungono 250 µl di Isopropanolo e 1 µl di Glicogeno,

che attacca l'RNA al fondo. Si agita bene e si centrifuga nuovamente a 12000 g per 15 minuti. Si forma così il pellet di RNA. Si rimuove il più possibile il surnatante, si aggiungono 500 µl di EtOH al 80%, e si centrifuga per 5 minuti a 7500 g. Si elimina il surnatante e si lascia asciugare il pellet a temperatura ambiente 5 minuti. Si aggiungono 20 µl di H₂O DEPC nucleases-free per risospendere il pellet. Ogni campione viene successivamente trattato con DNasi per eliminare eventuali contaminazione di DNA. L'integrità dello stato fisico dell'RNA viene valutata tramite migrazione su gel di agarosio allo 0,5%. La corsa elettroforetica consente di evidenziare le tre forme di rRNA (5S, 16S e 23S).

3.1.6 RETROTRASCRIZIONE

Il processo di retrotrascrizione permette, partendo da molecole di RNA, la sintesi di molecole complementari di DNA (cDNA) utilizzate per la reazione a catena della polimerasi in tempo reale (real-time PCR). Il processo prevede l'utilizzo della trascrittasi inversa (RT, Life Technology).

In provette da 200µl, sono stati introdotto 10µl di campione, diluito opportunamente in base al campione preso in considerazione in modo da avere circa 500 ng di RNA (quantificati tramite spettrofotometro), e 10µl di mix costituita da:

- 4,2µl di RNase Free Water;
- 2µl di RT Buffer;
- 0,8µl di dNTP;
- 2µl Random Primer;
- RT 1µl per campione;

Dopo avere mescolato meticolosamente, le provette sono state sottoposte all'azione del Minicycler, il quale sottopone i campioni a diversi cicli a temperature differenti, tali da poter avviare la reazione di retrotrascrizione. Si è ottenuto quindi il cDNA, e per dimostrare l'efficienza della reazione è stata effettuata una PCR di controllo, con l'utilizzo di una miscela 2xReadyMix con Mg²⁺ (10µl per campione), come primer è stato utilizzato il 18s (0,8µl Forward, 0,8 Reverse per campione) per il cDNA, e il GAPDH per il DNA; 5µl di campione (diluito opportunamente) e una quantità di DEPTC Water tale da raggiungere 20µl totali di soluzione. La reazione di PCR prevede, dopo la denaturazione iniziale del cDNA a 94°C per 2min, la ripetizione di 30 cicli in cui si ha una seconda denaturazione per 30s a 94°C, l'accoppiamento a 60°C per 30s, l'estensione a 72°C per 1min/kb. L'estensione finale avviene a 72°C per altri 7min. Dopo la PCR, è stato analizzato il prodotto della reazione su gel di agarosio all'1%.

3.1.7 REAL-TIME PCR

Per l'analisi quantitativa dell'espressione di dei diversi geni di interesse è stata usata la metodica della real-time PCR.

In una reazione tipica, il prodotto di PCR si raddoppia ad ogni ciclo dell'amplificazione. Siccome sono necessari parecchi cicli affinché si produca una quantità di prodotto rilevabile, il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli mostra un andamento sigmoide. Nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi. Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è chiamato il ciclo della soglia (valore di Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare. La pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR. I prodotti di PCR possono essere quantificati generando una retta standard oppure rapportando la loro quantità rispetto a quella di un gene di controllo. La quantificazione basata su una retta standard, quantificazione assoluta, utilizza DNA plasmidico o altre forme di DNA a concentrazione nota; il metodo della quantificazione relativa si basa invece sulla quantificazione dei geni di controllo o *housekeeping* a cui rapportare l'espressione del gene studiato.

Come metodo di quantificazione sono state utilizzate molecole fluorescenti (SYBR Green) che intercalano con il DNA doppio-filamento (ds).

Per condurre le amplificazioni di real time PCR è stato utilizzato lo strumento Chrome 4 (BioRad) impostando il seguente programma: un'iniziale denaturazione per 5 minuti a 95°C, 40 cicli composti da 30 secondi di denaturazione a 95°C, 1 minuto di appaiamento dei primers ed estensione a 60°C.

La fluorescenza si genera attraverso reazioni chimiche di legame di una molecola fluorescente, il SYBR Green (KAPA SYBR FAST), che si intercala alla doppia elica di DNA legandosi nel solco minore.

La reazione è condotta con i diversi primers per i diversi geni:

GENE	SEQUENZA
T-bet	Forward 5'- GCGCCAGGAAGTTTCATTG -3'

	Reverse 5'- GGAAAGTAAAGATAT GCGTGTTGG- 3'
IL-2	Forward 5'- AGTGCACCTACTTCAAGTTCTAC -3' Reverse 5'- GAAGATGTTTCAGTTCTGTGGC -3'
18S	Forward 5'- GTAACCCGTTGAACCCATT -3' Reverse 5'- CCATCCAATCGGTAGTAGCG -3'
Eomes	Forward 5'- TCATTACGAAACAGGGCAGG 3' Reverse 5'- TGCATGTTATTGTCGGCTTTG -3'
IFN-γ	Forward 5'- TGACCAGAGCATCCAAAAGAG -3' Reverse 5'- CGACAGTTCAGCCATCACTTG -3'
Bcl-2	Forward 5'- GATCCAGGATAACGGAGGC -3' Reverse 5'- GGCATGTTGACTTCACTTGTG -3'
Blimp-1	Forward 5'- ACTGGGTAGAGATGAACGAGAC -3' Reverse 5'- CCACAGAGTCATATCCGCATC -3'

Si prepara una mix di reazione, in un volume finale di 15 μ l, contenente:

- KAPA SYBR FAST 7.5 μ l
- Primer F 10 μ M 0.5 μ l
- Primer R 10 μ M 0.5 μ l
- cDNA 4 μ l diluito 1:10
- H₂O per arrivare a volume

I dati vengono analizzati con il programma Bio-Rad CFX Manager. L'analisi dei livelli degli mRNA è stata misurata attraverso il confronto, per singoli geni, dei Ct dei campioni non trattati (NT) con i Ct dei campioni trattati con Tat, entrambi normalizzati con il gene housekeeping 18S. Dal confronto dei Ct del gene di interesse e del controllo endogeno si ricava il Δ Ct (Δ Ct = Ct gene di interesse - Ct gene housekeeping); il valore ottenuto si mette come apice di una potenza in base 2 (2^{Δ Ct) in modo da avere il numero di copie ottenute al termine dei cicli; l'operazione successiva è $1/(2^{\Delta$ Ct), per normalizzare. Si fa poi la media dei

valori ottenuti e si applica la formula della deviazione standard e con questi ultimi valori si disegnano dei grafici ponendo in relazione il campione non trattato con quello trattato con Tat e si calcola il “fold increase”, con cui vediamo l’incremento o il decremento dell’espressione di mRNA del campione trattato rispetto al campione non trattato (Fold increase = {media del trattato/media del NT}). I livelli di mRNA sono indicati come espressione relativa al controllo endogeno e al riferimento. L’analisi statistica viene effettuata utilizzando il Wilcoxon signed-rank test

3.1.8 CITOFLUORIMETRIA A FLUSSO

Questa tecnica viene generalmente eseguita marcando la cellula con sonde fluorescenti che sono specifiche per queste molecole e misurando la quantità di fluorescenza emessa dalla cellula stessa.

Il citofluorimetro a flusso è un particolare strumento che può rilevare la fluorescenza emessa da una singola cellula in sospensione e quindi determinare il numero delle cellule che esprimono la molecola a cui la sonda fluorescente si lega. Sospensioni di cellule vengono incubate con sonde fluorescenti (generalmente costituite da anticorpi specifici marcati con fluorocromi) la cui quantità viene misurata facendo passare una alla volta le cellule in un raggio laser. È possibile paragonare la quantità relativa di una determinata molecola espressa in diverse popolazioni cellulari colorando ogni popolazione con lo stesso anticorpo e determinando la quantità della fluorescenza emessa. I moderni citofluorimetri possono rilevare routinariamente tre o più segnali fluorescenti di diverso colore, ciascuno legato a un diverso anticorpo. Oltre a rilevare un segnale fluorescente, i citofluorimetri misurano anche la proprietà della cellula di disperdere la luce anteriormente e lateralmente, parametri che riflettono rispettivamente le dimensioni cellulari e la struttura interna.

ANALISI DI MARKER DI SUPERFICIE

Per l’analisi dell’espressione di molecole extracellulari coinvolte nell’attivazione, 500.000 linfociti T totali, in condizioni *resting* o attivati, e trattati o meno in presenza di Tat, vengono risospesi in 1ml Flow Cytometry Staining Buffer (PBC + 1% FCS) e lavati a 1200 rpm per 6 min. Il pellet ottenuto si risospende in 50 µl di mixture ottenuta dagli anticorpi desiderati e il Flow Cytometry Staining Buffer. Si utilizzano diverse mixtures di anticorpi.

L’incubazione con gli anticorpi dura 30 minuti a 4 °C. Successivamente le cellule vengono lavate con 1 ml di Flow Cytometry Staining Buffer a 1200 rpm per 6 min. Si risospende il pellet in 200 µl di Flow Cytometry Staining Buffer e si lascia il tutto a 4°C fino al momento della lettura al FACS.

INTRACELLULAR STAINING

Per l'analisi del rilascio di citochine, le cellule vengono trattate, durante la stimolazione, con brefeldina A (Golgi-plug, BD), la quale impedisce il rilascio extracellulare. Terminato il tempo di stimolazione, le cellule vengono lavate ed incubate con anti-CD4 per 30 minuti a 4°. Successivamente, le cellule sono trattate con citofix-citoperm (BD), che consente la permeabilizzazione della membrana cellulare, ed incubate per 30 minuti a 4° con anti-IFN γ , anti-IL-2 o anti-TNF α . Dopo ulteriore lavaggio in Perm/wash (BD), si risospende il pellet in 200 μ l di Perm/wash e si lascia il tutto a 4°C fino al momento della lettura al FACS.

Gli anticorpi fluorescenti utilizzati sono stati:

CD4 (FITC-PE-PercP Immunotools)

CD44 (PE Immunotools)

CD62L (FITC-PE Immunotools)

CD45RA (PE Dy647 Immunotools)

CD27 (FITC BD, Miltenyi Biotec)

CCR7 (PE Miltenyi Biotec)

CD38 (FITC Immunotools)

CD25 (PE Immunotools)

HLADR (PE Immunotools)

CD127 (PercP BD)

Le strategie di colorazione sono state diverse a seconda della popolazione cellulare che voleva essere identificata, così come la fluorescenza dell'anticorpo utilizzato.

PROLIFERAZIONE CELLULARE

La proliferazione cellulare attraverso la tecnica citofluorimetrica è stata valutata tramite staining con CFSE. PBL totali sono stati incubati con una soluzione 5 μ M di 5(6)-carbossi-fluorescina succinil imidil estere diacetato (CFSE, eBioscience) per 10 minuti a 37°C in terreno completo. I dati sono stati acquisiti con BD FACScan e analizzati utilizzando il software BD Cell Quest Pro.

Per l'analisi statistica è stato usato il Wilcoxon signed-rank test (è un test non parametrico che si applica nel caso di un singolo campione con due misure accoppiate).

3.1.9 TEST MTT

Il test MTT è stato usato per valutare la sopravvivenza cellulare. Sono stati messi in coltura PBL totali in piastra da 96 pozzetti, in triplicato, alla concentrazione di 1×10^5 in un volume finale di 130 μl di terreno senza siero, e Tat è stata aggiunta alla concentrazione di 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Le cellule sono state lasciate in coltura per 6 giorni, poi sono stati aggiunti 25 μl di una soluzione di bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio 12mM (MTT, Sigma-Aldrich). Dopo 2 ore di incubazione sono stati aggiunti 100 μl di buffer di lisi (50% DMF + 20% SDS, pH 4,7) per ridurre l'MTT a formazano che rende la soluzione di colore blu/viola. Dopo ulteriori 18 ore di incubazione, l'assorbanza, proporzionale al numero di cellule vive, è stata misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570nm.

3.2 ANALISI IN VIVO

3.2.1 TAT PROTEINA

La proteina Tat di HIV-1 è stata prodotta in E.Coli e conservata a -80°C. Tale proteina è stata fornita dall' Istituto Superiore di Sanità in tampone fosfato 0,15 M alla concentrazione di 30µg/500µl; al momento dell'utilizzo è stata mantenuta in ghiaccio ed al buio, ed è stata diluita in base alle esigenze sperimentali. Tutto il materiale plastico, comprese le siringhe, è stato avvinato con lo stesso tampone in cui è risospesa la proteina Tat.

3.2.2 PEPTIDE DI TAT

Tat peptide 1-20 (MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT) è stato sintetizzato con il metodo fase solida e purificato mediante HPLC al> 98% di purezza (UF Peptidi, Università degli Studi di Ferrara, Italia). Il peptide è stato risospeso in PBS, conservato a -20°C, e diluito in soluzione fisiologica immediatamente prima dell'utilizzo.

3.2.3 ANIMALI E STABULAZIONE

Gli esperimenti con gli animali sono stati condotti secondo le linee guida europee e istituzionali per l'alloggio e la cura degli animali da laboratorio ed eseguiti secondo protocolli approvati dal Ministero della Salute italiano. Sono stati utilizzati topi BALB/c femmine di sei settimane di età (Charles River Laboratories, Lecco, Italy), sono stati ordinate di cinque settimane e mantenuti nello stabulario per una settimana prima degli inizi del protocollo sperimentale. La stabulazione è avvenuta sotto stretto controllo veterinario, all'interno di apposite gabbie inserite in moduli con aria purificata e con un massimo di 6 topi per ogni gabbia. Gli animali sono stati osservati dopo 1, 2, 6 e 24 ore e due volte a settimana dopo le immunizzazioni per verificare eventuali anomalie spontanee

3.2.4 PROTOCOLLI SPERIMENTALI

Gruppi di 6 topi sono stati immunizzati per via intradermica (ID) con tre diverse dosi della proteina Tat: 30 µg, 7,5 µg e 1 µg. Le immunizzazioni sono state effettuate ai giorni 1, 14 e 28; al giorno 42 gli animali sono stati sacrificati ed è stato raccolto il siero tramite prelievo oculare per analizzare i titoli anticorpali (figura 3.5).

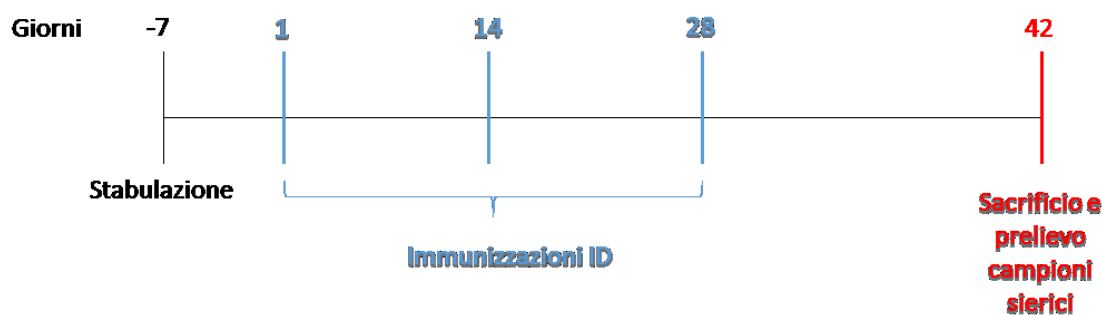


Figura 3.5: Time line del protocollo di immunizzazione effettuato con le dosi di Tat 30 μ g, 7,5 μ g e 1 μ g per via ID, e del prelievo dei campioni anlizati.

Per i protocolli sperimentali riguardanti le diverse vie di somministrazione, sono stati effettuati due diversi esperimenti, rispettivamente da 3 e 4 topi per gruppo.

Gruppi di topi Balb/C, femmine di 6 settimane sono state immunizzate ID, intramuscolo (IM) o attraverso la mucosa orale (OM) con la dose di Tat di 30 μ g.

Le vaccinazioni ID e IM sono state effettuate in due siti del dorso per un volume di 250 μ l per ogni iniezione, mentre per la vaccinazione OM, gli animali sono stati privati dell'acqua nelle sei ore precedenti, e l'immunogeno è stato fatto assorbire nella cavità orale attraverso l'utilizzo di un puntale.

Le immunizzazioni sono state effettuate ai giorni 1,14 e 28, mentre i campioni di siero, lavaggi vaginali e intestinali sono stati raccolti al giorno del sacrificio degli animali (figura 3.6).

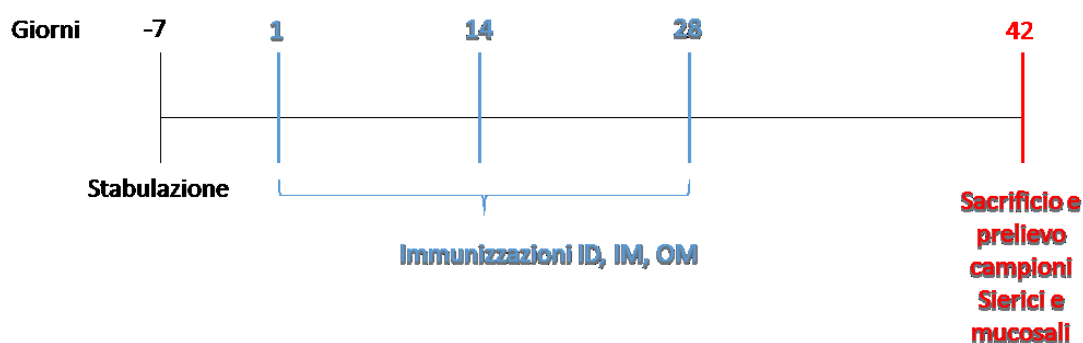


Figura 3.6: Time line del protocollo di immunizzazione effettuato con Tat 30 μ g, per via ID, Im e OM e del prelievo dei campioni anlizati.

Lo stesso protocollo sperimentale è stato ripetuto per le immunizzazioni avvenute utilizzando il peptide di Tat 1-20 alla dose di 7 μ g, per via ID e OM.

3.2.5 RACCOLTA DEI CAMPIONI PER LE ANALISI IMMUNOLOGICHE

SIERO

Il sangue è stato prelevato dall'occhio del topo precedentemente anestetizzato con isofluorano utilizzando canule simili a capillari di vetro (FISHER SCIENTIFIC, Pittsburg, PA). Dopo ogni intervento sull'animale, la ferita è stata pulita con PBS. Ciascun campione di sangue (500µl/topo circa) è stato raccolto in provetta Eppendorf, incubato a 4°C per 16 ore e centrifugato a 10000rpm per 10 minuti. Il siero così ottenuto è stato aliquotato e conservato a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

LAVAGGI MUCOSALI

I campioni mucosali sono stati ottenuti al momento del sacrificio.

La cavità vaginale è stata lavata con 250µl di soluzione tampone costituita da PBS+ 5% di siero fetale bovino (Invitrogen), raccolto in provetta Eppendorf ed incubato per 1 ora in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C, al surnatante sono stati aggiunti 5µl di PMSF 1M (inibitore delle serin-proteasi) e 5µl di NaN₃ all'1% (Sigma). Ciascun campione è stato quindi aliquotato e conservato a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

La cavità intestinale è stata prelevata dopo il sacrificio e lavata con 1ml di soluzione tampone composta da PBS e un cocktail di inibitori proteici (Roche), dopo incubazione in ghiaccio, I campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 4°C a 10000 rpm e aliquotati. Sono stati conservati a -20°C fino all'utilizzo.

3.2.6 ANALISI IMMUNOLOGICHE

Titoli anticorpali IgG, IgM e IgA anti-Tat e anti-Tat 1-20 sono stati determinati tramite test ELISA. Le piastre (Nunc maxi sorp) sono state pre-adsorbite con 100 ng di Tat o di Tat 1-20 in 0.2 ml di una soluzione 0.05 M di tampone carbonato (pH 9.6) per 18 ore a 4°C. Le piastre sono state lavate, utilizzando un washer automatico (BioRad Model 1575 ImmunoWash) con PBS + 0.05% Tween 20 (Sigma) e successivamente bloccate per 90 minuti a 37°C con l'aggiunta di una soluzione di blocco. Le soluzioni utilizzate sono state: PBS + 0.05 % Tween 20 e 1% BSA (per le IgG); PBS + 0.05 % Tween 20 e 3% BSA (per le IgM); PBS + 0.1 % Tween 20 (per le IgA). Dopo diversi lavaggi per rimuovere l'eccesso di antigene, vengono piastrati in doppio pozzetto 100 µl/well di una appropriata diluizione per ogni siero/lavaggio da analizzare, e incubate per 90 minuti a 37°C per IgG e IgA, 60 minuti a 37 °C per le IgM. Le piastre vengono nuovamente lavate prima di aggiungere 100

μ l/well di anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano anti- IgG, IgM or IgA (Sigma), e incubate a 37°C per 90 minuti. Dopo l'incubazione, le piastre vengono lavate cinque volte e poi viene aggiunta la soluzione substrato della perossidasi ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) (Roche). I valori di assorbanza sono misurati alla lunghezza d'onda di 405 nm dopo 50 minuti con uno spettrofotometro (SUNRISE TECAN Salzburg-Austria). In ciascuna piastra sono stati inseriti 3 controlli negativi diluiti 1:100 (rappresentati da sieri/lavaggi di topi immunizzati con soluzione fisiologica), ed un controllo positivo (rappresentato da un pool di sieri/lavaggi di topi positivi). Il valore di cut-off è stato stimato come il valore medio di OD di 3 sieri di controllo negativo, più 0,05. Ogni valore OD è stato sottratto del bianco e dei valori cut-off per ottenere un valore netto OD. I titoli di Ig sono stati calcolati in base alla funzione intercetta utilizzando il programma Excel.

4. RISULTATI

4.1 IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO DELLA PROTEINA TAT NELL'INFEZIONE DA HIV

I linfociti T CD4⁺ hanno un ruolo molto importante nell'infezione da HIV, in quanto costituiscono il target principale di infezione virale. Un possibile effetto di Tat sull'attivazione dei linfociti T CD4⁺ resting o sull'aumento dei livelli di attivazione di linfociti già differenziati, potrebbe rivelare informazioni importanti sui meccanismi di infezione e su un possibile ruolo della proteina Tat nel favorirla.

4.1.1 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI TAT SULL'ATTIVAZIONE FUNZIONALE DEI LINFOCITI T CD4⁺

Per determinare l'effetto di Tat sull'attivazione dei linfociti T CD4⁺, è stata valutata la capacità di Tat di modulare la trascrizione dei geni che codificano per IL-2 e IFN γ , molecole prodotte dai linfociti T in seguito ad attivazione. Per tale scopo, i linfociti T CD4⁺ sono stati separati da sangue intero di donatori sani e trattati per 4 ore in presenza o assenza della proteina Tat alla concentrazione di 0,1 μ g/ml. Queste analisi condotte su linfociti non stimolati non hanno evidenziato effetti della proteina Tat sull'espressione dei geni che codificano per IL2 e IFN γ (dati non mostrati). Successivamente linfociti T CD4⁺ sono stati stimolati per 4 ore con anticorpi anti-CD3 e anti-CD28, per simulare in vitro le condizioni fisiologiche di stimolazione antigenica, in presenza o in assenza della proteina Tat.

Come mostrato in figura 4.1A, l'espressione di IL-2 risulta aumentare più del doppio nei campioni trattati con anti-CD3/CD28 in presenza della proteina Tat rispetto ai campioni stimolati con solo anti-CD3/CD28, così come l'espressione di IFN γ risulta aumentata nei linfociti T CD4⁺ attivati in presenza di Tat. Si può quindi dedurre che la proteina Tat abbia un effetto sull'aumento di IL2 e IFN γ sui linfociti T CD4⁺ attivati.

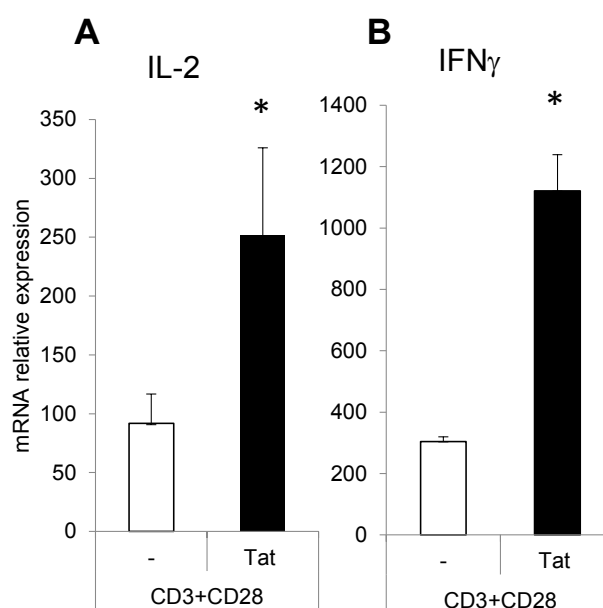


Figura 4.1: Livelli di espressione di mRNA di IL2 (A) e IFN γ (B) su CD4⁺ tramite Real Time PCR quantitativa. Analisi eseguita dopo 4 ore di stimolazione con anti-CD3/CD28 \pm Tat. Analisi statistica effettuata utilizzando il Wilcoxon signed-rank test. * $p < 0.05$, n=6-8

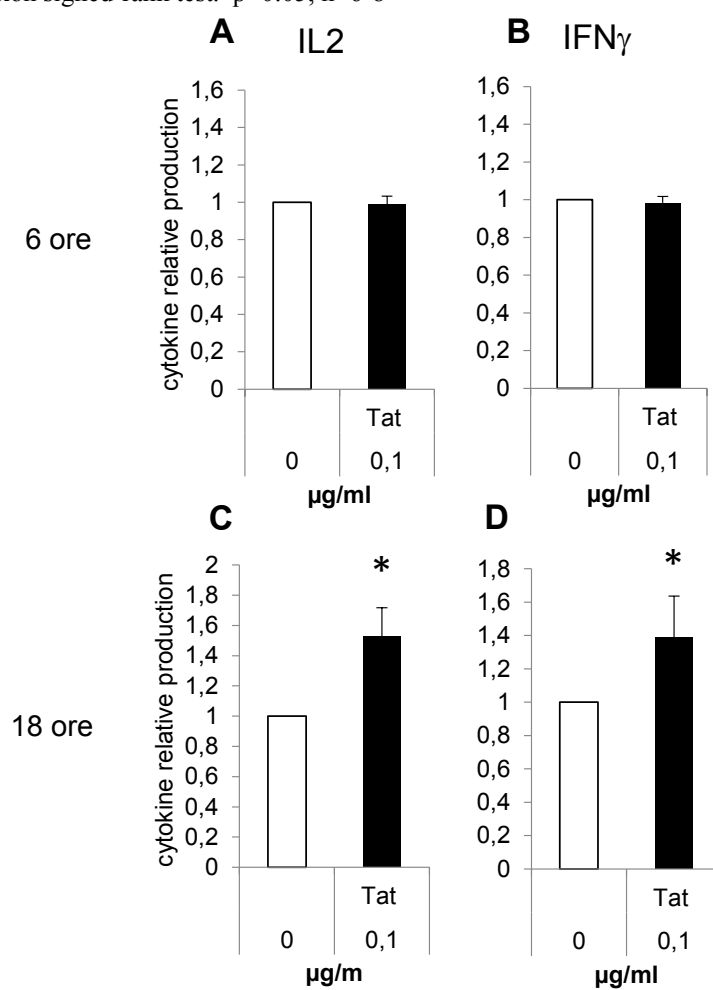


Figura 4.2. Livelli di secrezione di IL-2 e IFN γ rilevati dopo 6 (A-B) e 18 ore (C-D) di trattamento con Tat in linfociti T CD4⁺. Analisi statistica effettuata utilizzando il Wilcoxon signed-rank test. * $p < 0.05$, n=6-8.

È stata inoltre valutata la produzione di IL-2 ed IFN γ , sempre in popolazioni di linfociti T CD4+, mediante intracellular staining. I linfociti sono stati trattati per 6 e 18 ore con la concentrazione di Tat 0,1 μ g/ml.

Lo studio del rilascio di citochine (figura 4.2 A-C) mostra che il trattamento con Tat aumenta i livelli di IL2 dopo 6, ma soprattutto dopo 18 ore di trattamento. I livelli di IFN γ rimangono pressoché invariati alle 6 ore nelle cellule trattate con Tat, mentre alle 18 ore si osserva un modesto ma significativo aumento del rilascio di IFN γ .

I dati relativi all'analisi tramite realtime PCR e al rilascio di IL2 e IFN γ , considerati nell'insieme, suggeriscono che Tat abbia un effetto sull'mRNA già dopo 4 ore, che viene confermato dopo 18 ore di trattamento sul rilascio di entrambe le citochine analizzate. Questi risultati confermano la capacità di Tat di aumentare l'attivazione funzionale dei linfociti T CD4+.

4.1.2 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI TAT SULLA PROLIFERAZIONE E SULLA SOPRAVVIVENZA DEI LINFOCITI T CD4+

L'effetto di Tat sulla proliferazione cellulare è stato valutato tramite la tecnica citofluorimetrica CFSE, sia su linfociti T CD4+ resting che su stimolati con anti CD3/CD28. L'analisi è stata effettuata al sesto giorno di trattamento con la proteina Tat (0,5 μ g/ml), e i dati sono mostrati in figura 4.3. Come si osserva in figura 4.3A, non ci sono differenze tra le cellule non trattate e quelle coltivate in presenza di Tat. In figura 4.3B si può osservare l'effetto dello stimolo di attivazione sulla proliferazione dei linfociti T CD4+, mentre non si osservano differenze con l'aggiunta della proteina Tat.

Per valutare l'effetto di Tat sulla vitalità dei linfociti T, sono stati messi in coltura cellule in presenza ed assenza di Tat, in terreno senza siero e senza nessuno stimolo. La sopravvivenza cellulare è stata valutata ai giorni 2, 4, 6 e 8, tramite test MTT e i dati sono mostrati in figura 4.4.

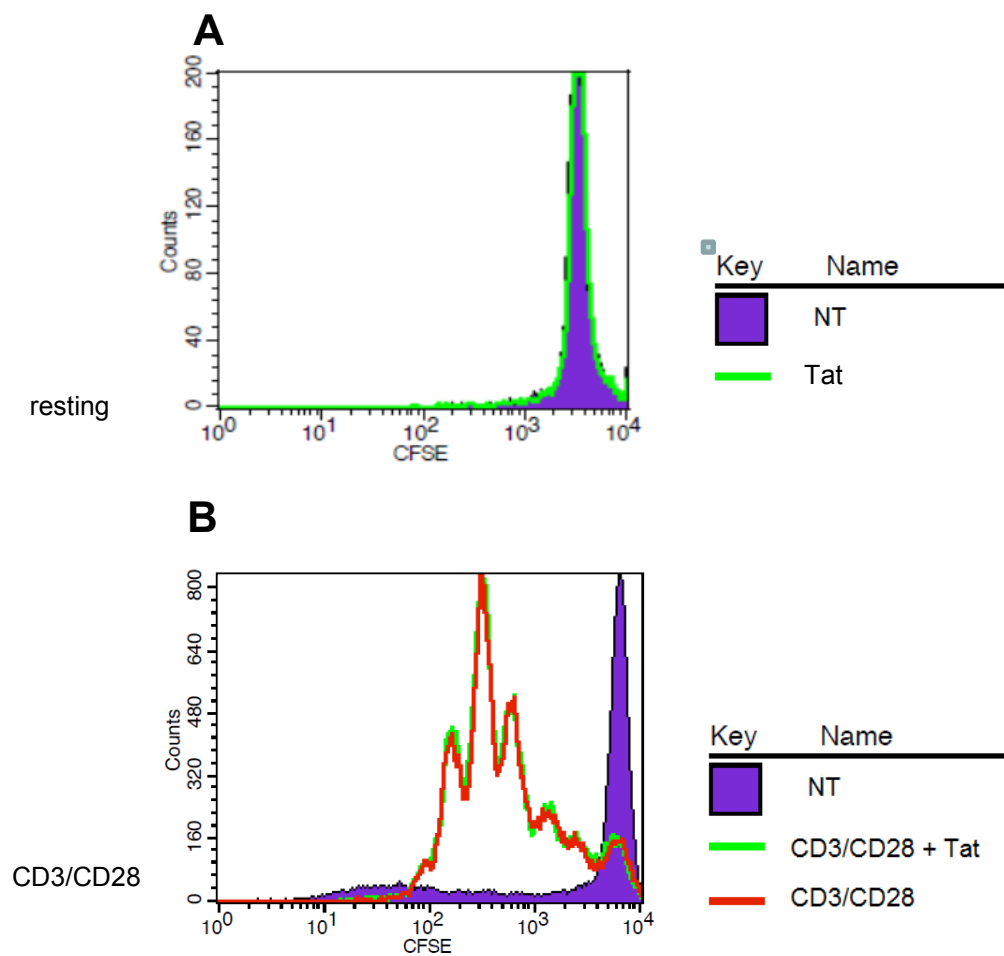


Figura 4.3: Analisi della proliferazione cellulare tramite tecnica citofluorimetrica del CFSE. (A) analisi su linfociti T CD4+ in assenza di stimoli, con aggiunta o meno di Tat. (B) analisi su linfociti T CD4+ stimolati con anti CD3/CD28 in presenza o assenza di Tat.

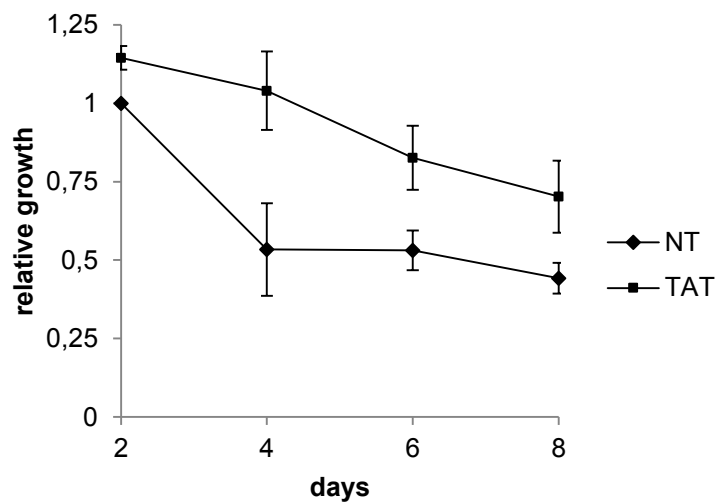


Figura 4.4: Test MTT su PBL totali trattati o meno con Tat, ai giorni 2,4,6 e 8 di cultura.

Come si osserva, il trattamento con la proteina Tat in assenza di qualsiasi stimolo di crescita e sopravvivenza cellulare, permette una migliore sopravvivenza delle cellule in coltura.

Per valutare l'effetto di Tat sulla sopravvivenza dei linfociti T CD4+, le cellule sono state messe in coltura in terreno addizionato con interleuchina 2 per 20 giorni, in presenza o meno di Tat con dose 0,5 µg/ml. Nell'arco di 20 giorni, le cellule sono state contate ai giorni 2, 6, 9, 12, 15 e 18 allo scopo di valutarne la crescita e la vitalità. Come mostrato in figura 4.5, la presenza della proteina Tat non modifica la vitalità e la crescita dei linfociti T CD4+ resting. In entrambe le condizioni è infatti possibile osservare un incremento del numero di cellule dal giorno 3 al giorno 6 che rimane poi relativamente costante fino al giorno 15 per diminuire, infine, al giorno 18.

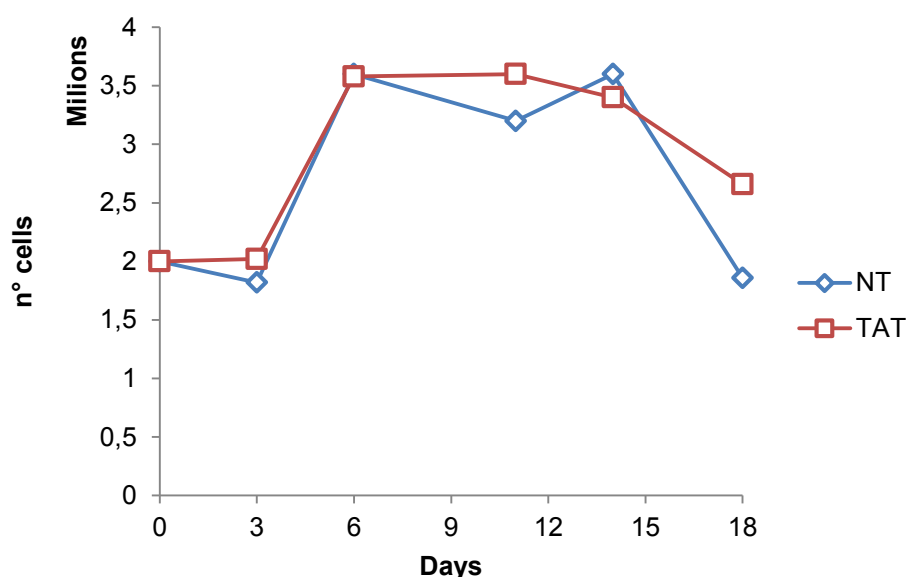


Figura 4.5: Andamento dell'espansione dei linfociti CD4+ totali trattati e non con Tat (NT, TAT).

4.1.3 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI TAT SU MARKER CHE INDICANO UNO STATO DI ATTIVAZIONE

È stato successivamente valutato se Tat fosse in grado di attivare le cellule non solo da un punto di vista funzionale ma anche fenotipico. A tale scopo è stata analizzata l'espressione di 3 marker solitamente upregolati nelle cellule attivate: CD25, la catena alfa del recettore dell'IL-2, la cui produzione è modulata dalla proteina Tat, HLA-DR e CD38. In particolare l'espressione di questi ultimi due fattori correla con una più veloce progressione dell'AIDS in soggetti sieropositivi e sono i marker di elezione per determinare lo stato di immunoattivazione cronica. Linfociti T separati da sangue intero di donatori sani sono stati coltivati in condizioni di riposo o stimolati con anti-CD3/CD28, in presenza o assenza della

proteina Tat ed analizzati dopo 24 ore di trattamento.

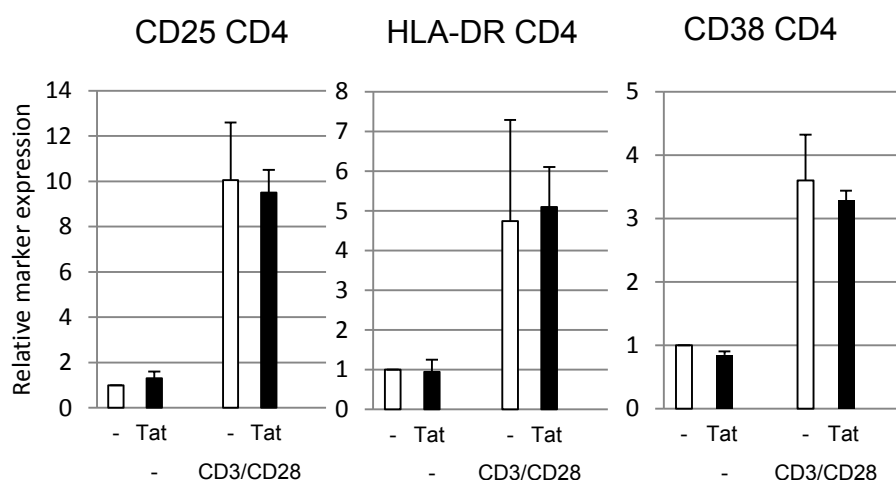


Figura 4.6. Livelli di espressione di marker indicanti uno stato di attivazione, analizzati tramite citofluorimetria a flusso in linfociti T CD4+ a 24 ore, condizioni resting e attivati. Analisi statistica effettuata utilizzando il Wilcoxon signed-rank test. * $p < 0.05$, $n = 6-8$.

Come si può osservare in figura 4.6, a parte lievi scostamenti dai livelli del controllo, Tat sembra non avere alcun effetto sull'espressione di marker che indicano uno stato di attivazione.

4.1.4 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI TAT SU FATTORI DI TRASCRIZIONE COINVOLTI NELL'ATTIVAZIONE

Diversi fattori trascrizionali giocano un ruolo importante nella transizione delle cellule CD4+ da naïve ad effettori, target ideali per l'infezione di HIV, e, successivamente, da effettori a memoria, cioè i *reservoir* virali. Quindi, per valutare l'eventuale modulazione da parte di Tat del programma trascrizionale dei linfociti T CD4+ sono stati misurati tramite real-time PCR quantitativa i livelli di mRNA di fattori chiave nelle funzioni dei linfociti T CD4+. In particolare è stata valutata l'espressione di T-bet, Eomes, Bcl2 e Blimp-1 in linfociti T CD4+ separati da sangue intero di donatori sani lasciati in condizioni resting o stimolati con anti CD3-CD28 in presenza o assenza di Tat. Le analisi sono state inizialmente effettuate dopo 4 ore di trattamento. Come si può osservare in figura 4.7 la proteina Tat non modula l'espressione dei fattori di trascrizione analizzati in condizioni resting, mentre si osserva una loro up-regolazione in condizioni di stimolazione con anti CD3/CD28.

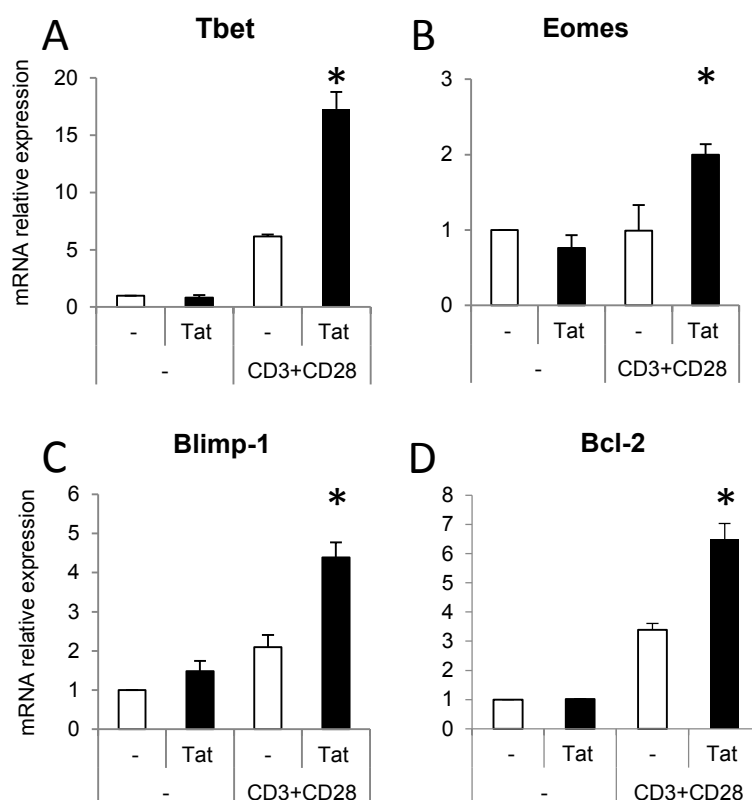


Figura 4.7 Livelli di espressione di mRNA rilevati dopo 4 ore di trattamento, in condizione resting e di stimolazione, con Tat 0,1 μ g/ml, in linfociti T CD4+. Analisi statistica effettuata utilizzando il Wilcoxon signed-rank test. * $p < 0.05$, $n = 6-8$. (A) Tbet; (B) Eomes; (C) Blimp-1; (D) Bcl-2.

Questi dati sembrano confermare quelli precedentemente descritti, in quanto anche l'analisi del profilo trascrizionale mostra un effetto di Tat nell'aumentare i livelli di attivazione di linfociti T CD4+ stimolati ma non dei linfociti T CD4+ resting.

Dato il ruolo importante dei linfociti T CD4+ resting nella cronicizzazione dell'infezione da HIV, è stato successivamente valutato se il trattamento con Tat di questa sottopopolazione per un tempo più lungo potesse modularne il profilo trascrizionale. Come mostrato in figura 4.8, il trattamento con la proteina Tat prolungato per 24 ore fa diminuire in maniera statisticamente significativa i livelli di espressione di Eomes e Blimp-1 (figura 4.8 B, D).

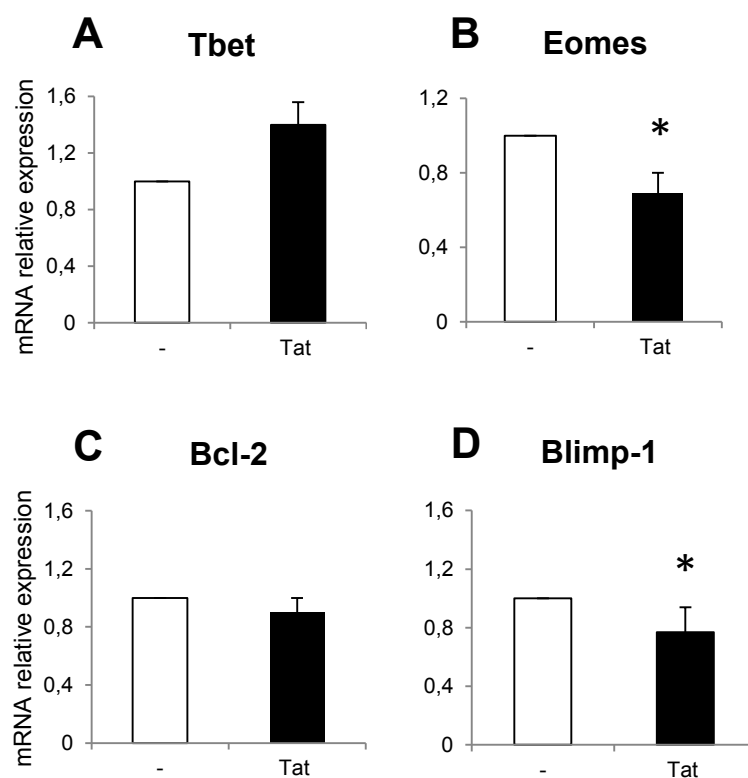


Figura 4.8. Livelli di espressione di mRNA rilevati dopo 24 ore di trattamento, in condizione resting, con Tat 0,1 µg/ml, in linfociti T CD4+. Analisi statistica effettuata utilizzando il Wilcoxon signed-rank test.

* $p < 0.05$, $n = 6-8$. (A) Tbet; (B) Eomes; (C) Blimp-1; (D) Bcl-2.

I dati ottenuti, nell'insieme, mostrano che la proteina Tat ha un effetto sulla stimolazione dei linfociti T CD4+ attivati, mentre non ha effetto sui linfociti resting. Si evidenzia un effetto sull'attivazione funzionale tramite rilascio di citochine, e rilevante è l'effetto sul profilo trascrizionale, mentre non si osservano effetti sulla proliferazione cellulare né sull'espressione fenotipica di marker di attivazione. Molto interessante è l'effetto notato sui fattori di trascrizione Blimp-1 ed Eomes, dove i dati ottenuti sui linfociti T CD4+ stimolati con anti-CD3/CD28 hanno andamenti opposti rispetto a quelli ottenuti sui linfociti resting. Questo sembra confermare il fatto che Tat abbia un effetto sull'attivazione dei linfociti T CD4+, e quindi un ruolo nell'aumentare le possibilità di infezione da parte di HIV, mentre è evidente che ha altri effetti sui linfociti T CD4+ resting, che necessitano di ulteriori analisi, in particolare, intrigante è il fenomeno di diminuzione dei livelli di espressione di Blimp-1 ed Eomes.

4.2 IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO DELLA PROTEINA TAT NELLA GENERAZIONE E NEL MANTENIMENTO DEI *RESERVOIR* VIRALI

I linfociti T CD4+ memoria sono noti essere la quasi totalità dei reservoir virali, cioè le cellule in cui il virus va in latenza. È importante riuscire ad individuare le caratteristiche di sviluppo e mantenimento di queste cellule, poiché ad oggi costituiscono uno dei maggiori impedimenti all'eradicazione virale. È interessante indagare se Tat sia coinvolta nella transizione dei linfociti T CD4+ verso un fenotipo memoria e nel loro mantenimento.

4.2.1 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI TAT SULLA DIFFERENZIAZIONE DI LINFOCITI T CD4+ IN ASSENZA DI STIMOLI

Per caratterizzare l'effetto della proteina Tat sui marker di differenziamento dei linfociti T CD4+, linfociti T totali sono stati trattati o meno con Tat alla dose di 0,5 µg/ml in assenza di stimoli di attivazione. Le cellule sono state lasciate in coltura per 7 giorni, in terreno addizionato con IL2, al termine dei quali sono stati analizzati marker di superficie volti ad identificare sottopopolazioni di linfociti T CD4+ memoria.

I marker analizzati sono mostrati in tabella 4.1.

	CD45RA	CCR7	CD62L	CD44	CD127
Naïve	+	+	+	-	+
Transitional memory	-	-	+/-	+	+
Effector memory	-	-	-	+	-
Central memory	-	+	+	+	+

Tabella 4.1: Discriminazione delle diverse sottopopolazioni di linfociti T CD4+ in base alla positività o negatività rispetto ai marker di espressione.

Il CD62L e il CD44 sono marker di homing linfocitario e attivazione funzionale rispettivamente, e la loro coespressione indica un fenotipo memoria nei linfociti CD4+. Il CD45RA è un marker di differenziamento, utilizzato per discriminare le cellule naïve da quelle in via di sviluppo, mentre il CD127 è il recettore dell'interleuchina 7, citochina coinvolta nello sviluppo e nel differenziamento dei linfociti T CD4+ memoria. È stata inoltre valutata l'espressione del CCR7, o CD197, anche questo marker di homing linfocitario,

tendenzialmente espresso in cellule memoria, soprattutto attivate, mentre non è espresso nelle cellule effettrici.

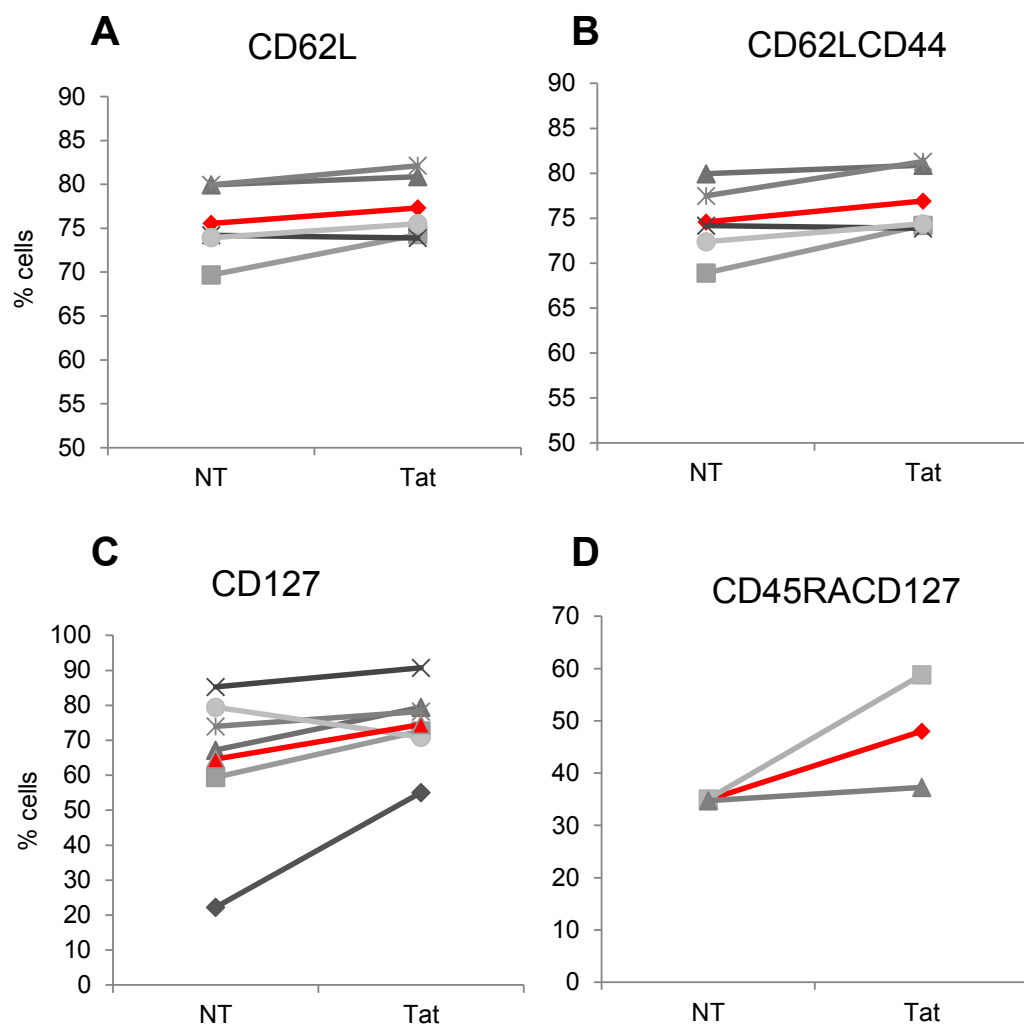


Figura 4.9. Effetto di Tat sul fenotipo di linfociti T CD4+ al giorno 7 di trattamento. Ogni linea è rappresentativa di un donatore, la linea rossa rappresenta la media dei donatori analizzati.

Come si osserva in figura 4.9, la proteina Tat sembra avere un effetto (statisticamente non significativo) nell'aumento percentuale di cellule con marker memoria come CD62L e CD127 (figura 4.9A-C).

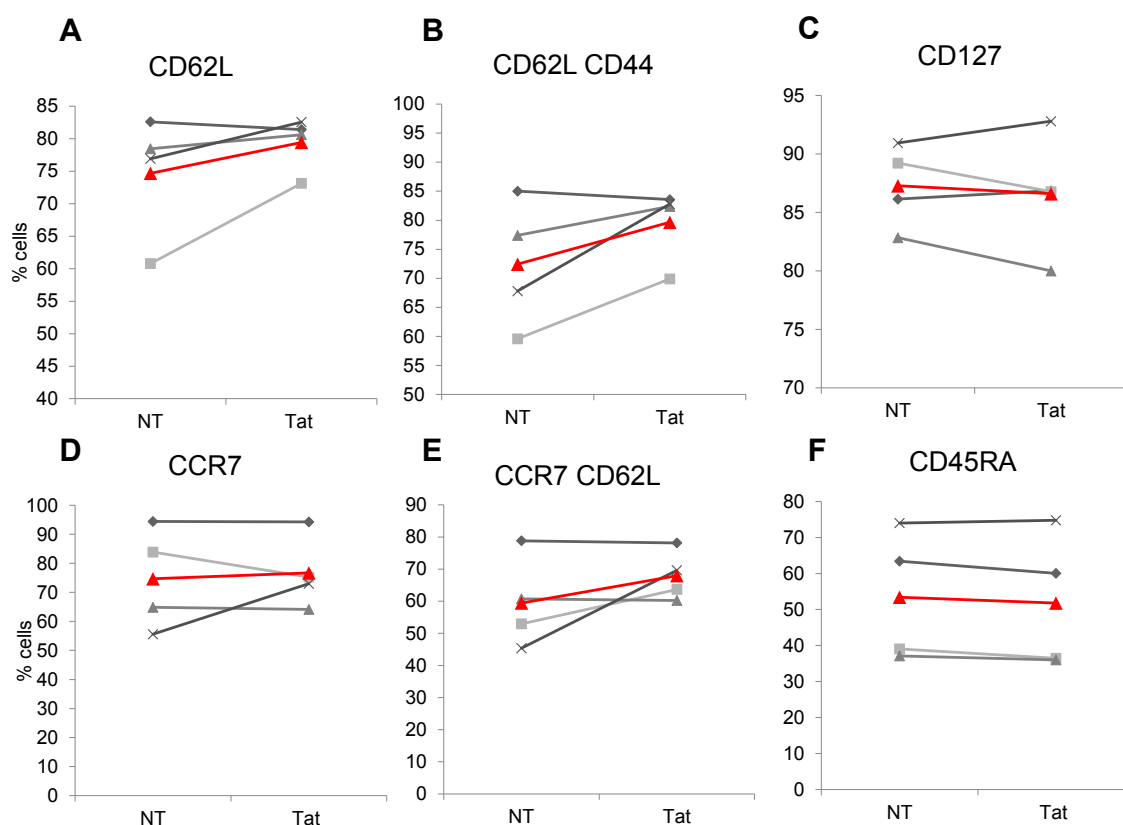


Figura 4.10 Effetto di Tat sul fenotipo di linfociti T CD4+ al giorno 7 di trattamento. Ogni linea è rappresentativa di un donatore, la linea rossa rappresenta la media dei donatori analizzati.

Per indagare ulteriormente l'effetto di Tat sui linfociti T CD4+, gli esperimenti sono stati ripetuti mettendo in coltura linfociti T CD4+, purificati tramite biglie magnetiche, trattati o meno con Tat per 7 giorni. In figura 4.10 si può osservare l'aumento percentuale di cellule che esprimono i marker di homing linfocitario CCR7 (figura 4.10 D) e CD62L (figura 4.10 A), anche in coespressione con CD44 mentre non è più rilevabile un effetto di Tat su CD127 e CD45RA (figura 4.10 C -F), effetto che probabilmente era dovuto alle condizioni di coltura precedenti, in cui lo stimolo veniva dato a PBL totali.

Da queste analisi si può osservare che il trattamento con la proteina Tat sembra favorire un aumento percentuale delle cellule che esprimono marker di superficie caratteristici dei linfociti memoria, indicando un suo probabile effetto nella transizione dei linfociti T CD4+ verso un fenotipo memoria. Questo effetto si osserva sia trattando con Tat PBL totali da cui vengono poi analizzati i linfociti T CD4+, sia utilizzando un metodo sperimentale più specifico, che prevede l'utilizzo selettivo dei solo linfociti T CD4+.

Un'analisi più approfondita dal punto di vista fenotipico per identificare le sottopopolazioni di linfociti T CD4+ memoria è stata effettuata seguendo il protocollo sperimentale mostrato in figura 4.11.

La raccolta dei campioni per le analisi al citofluorimetro, è stata eseguita ai giorni 7, 14 e 20, per poter valutare l'effetto di Tat anche a tempi più lunghi. In particolare, è stato identificato il fenotipo di quattro diverse sottopopolazioni linfocitarie (naïve, effector memory, transitional memory e central memory) e verificato l'effetto della proteina Tat su queste diverse sottopopolazioni. I marker di espressione utilizzati per questa ulteriore discriminazione sono rappresentati dalle molecole di superficie CD45RA, CCR7 e CD27.

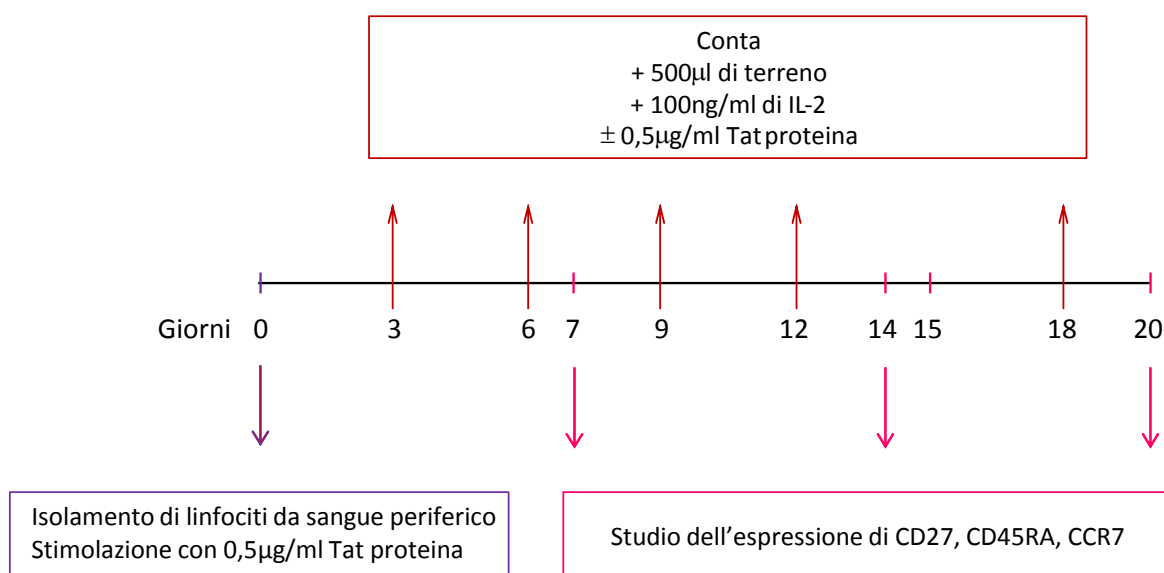


Figura 4.11: Time line del protocollo di stimolazione effettuato sui linfociti T CD4+.

Il CD27 è un importante marker di attivazione ed espansione, costitutivamente espresso sulle cellule memoria e fortemente up regolato dopo attivazione delle cellule naïve. Può essere inoltre collegato alla sopravvivenza delle cellule durante la fase di espansione, per questo risulta fondamentale la sua analisi nell'identificazione di differenziamento e sopravvivenza di linfociti T CD4+ memoria [9].

L'analisi dei dati effettuati al citofluorimetro, prevede una prima selezione della popolazione linfocitaria indicata con R1 nel grafico in cui vengono espresse grandezza (FSC) e granulosità (SSC) delle cellule acquisite al citofluorimetro a flusso (figura 4.12); all'interno delle popolazione R1 è possibile identificare quattro diverse popolazioni caratterizzate dalla positività o negatività ai due marcatori di superficie CD45RA in ascissa e CCR7 in ordinata (figura 4.12 B). Nel riquadro R2 sono racchiuse le cellule CD45RA- CCR7+, in R3 le cellule

CD45RA+ CCR7+, in R4 le cellule CD45RA- CCR7- e in R5 le cellule CD45RA+ CCR7-. Inoltre, lo studio del CD27 permette la discriminazione dei quattro fenotipi: naïve (figura 4.12 D), transitional memory (figura 4.12 F), effector memory (figura 4.12 F) e central memory (figura 4.12 C), come indicato in tabella 4.2.

	CD45RA	CCR7	CD27
Naïve	+	+	+
Transitional memory	-	-	+
Effector memory	-	-	-
Central memory	-	+	+

Tabella 4.2: Discriminazione delle diverse sottopopolazioni di linfociti T CD4+ in base alla positività o negatività rispetto ai marker di espressione.

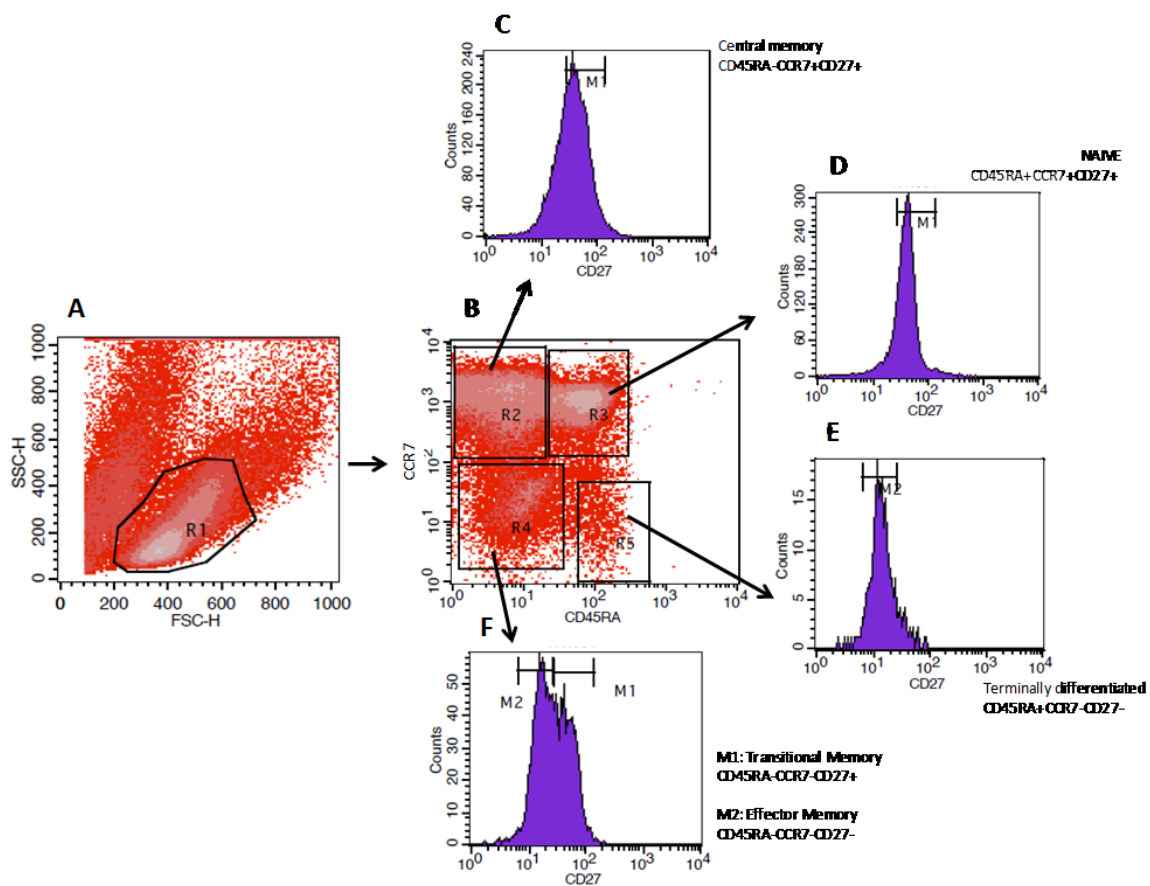


Figura 4.12: Rappresentazione grafica delle popolazioni linfocitarie mediante analisi al citofluorimetro a flusso.

Il CD27 risulta essere fondamentale per distinguere i linfociti T CD4⁺ transitional memory (CD27⁺) dagli effector memory (CD27⁻) entrambi negativi al CD45RA e al CCR7 (figura 11F). In figura 4.12 E sono rappresentate le cellule definite terminally differentiated che non sono oggetto di questo studio.

I dati acquisiti al citofluorimetro a flusso sono stati elaborati ed espressi in figura 4.13, dove si osserva che l'andamento delle quattro sottopopolazioni linfocitarie non varia significativamente con l'aggiunta della proteina Tat dopo 7 giorni di trattamento. Tuttavia al giorno 14 è possibile osservare che la presenza di Tat favorisce l'espressione dei marker caratteristici della popolazione T CD4⁺ central memory, non inducendo invece effetti significativi su quelli caratterizzanti le altre popolazioni.

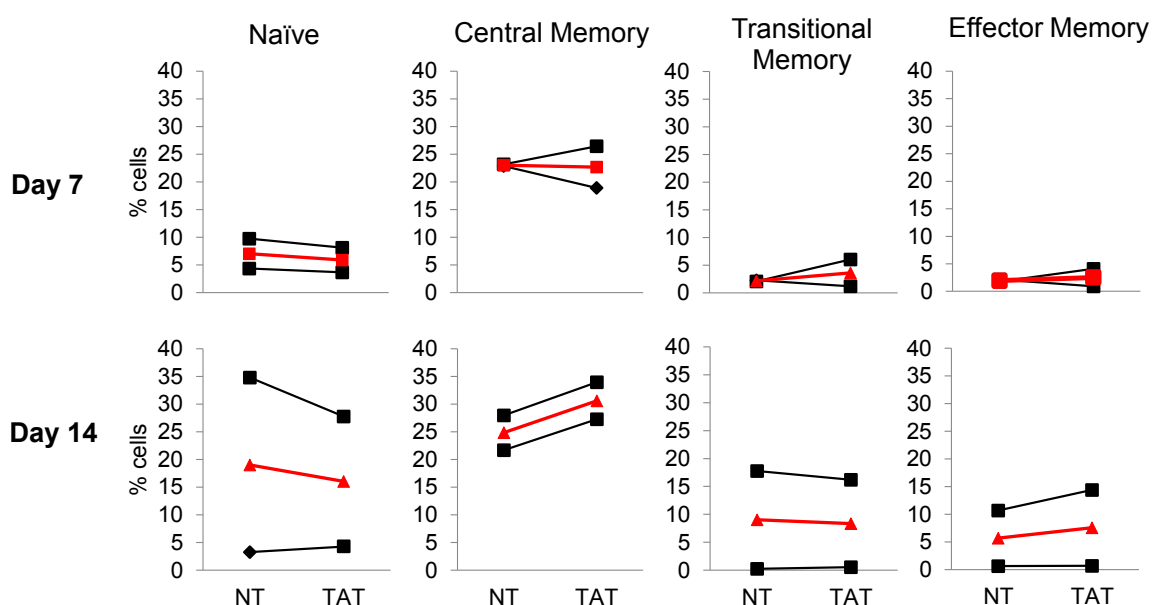


Figura 4.13: Effetto di Tat sulla differenziazione dei linfociti T CD4⁺ totali, osservato ai giorni 7 e 14. Ogni linea è rappresentativa di un donatore, la linea rossa rappresenta la media dei donatori analizzati.

4.2.2 VALUTAZIONE DI UN MODELLO IN VITRO PER LA GENERAZIONE DI LINFOCITI T CD4⁺ CENTRAL MEMORY ED EFFETTI DELLA PROTEINA TAT

LINFOCITI T CD4⁺ NAÏVE

Per valutare ulteriormente il ruolo della proteina Tat sul differenziamento e sul mantenimento dei linfociti T memoria, è stato messo a punto un modello sperimentale in grado di generare in vitro una popolazione di linfociti T CD4⁺ corrispondenti linfociti T CD4⁺ central memory in vivo. Questa particolare sottopopolazione linfocitaria è stata ottenuta tramite la stimolazione di linfociti T CD4⁺ naïve, ottenuti per selezione negativa a partire da PBL totali di donatori sani, e stimolati in condizioni di “non polarizzazione”. Il protocollo sperimentale (figura 4.14) volto ad ottenere una popolazione cellulare resting o non polarizzata, caratterizzata da una bassa attività sia dal punto di vista proliferativo che di differenziazione, richiede l’utilizzo di molteplici stimoli.

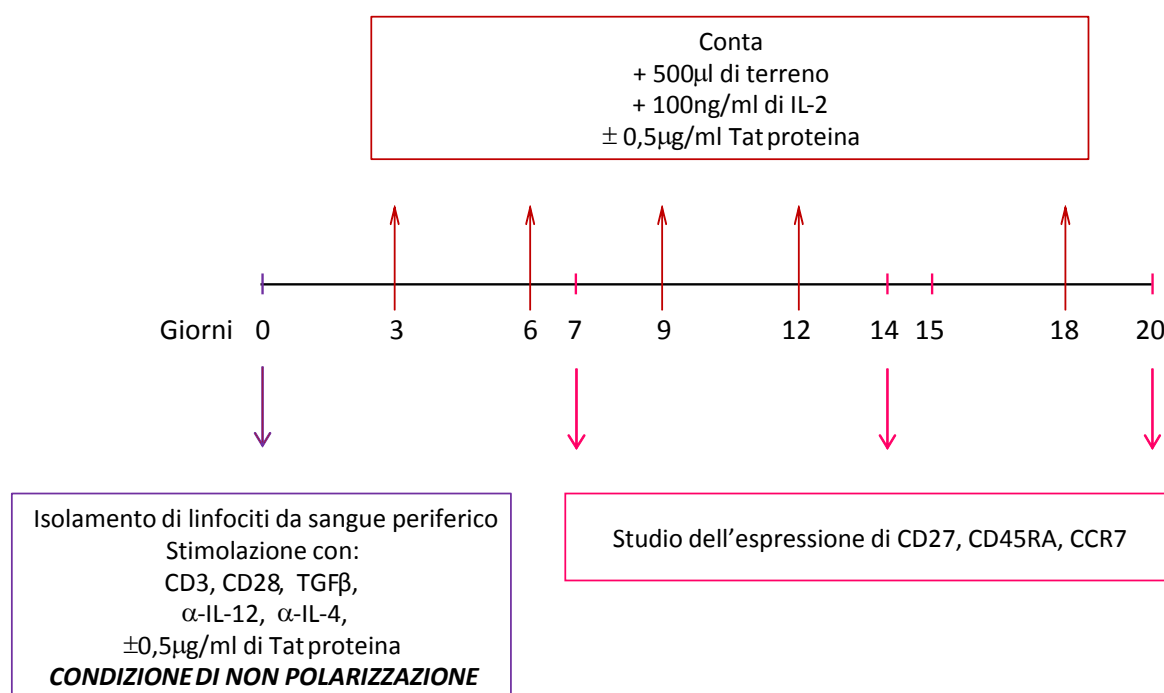


Figura 4.14: Time line del protocollo di stimolazione effettuato sui linfociti T CD4⁺ naïve in condizioni di non polarizzazione.

Le cellule T CD4⁺ naïve vengono stimulate utilizzando anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 così da innescarne l’attivazione, mentre per guidarne la differenziazione verso un fenotipo central memory (corrispondente al non polarizzato) si utilizzano anticorpi anti-interleuchina-12, inibenti la formazione di linfociti T helper 1, e anticorpi anti-interleuchina-4 inibenti la formazione di linfociti T helper 2. Viene inoltre utilizzato il Trasforming Growth Factor β 1 (TGFβ1) poiché rappresenta un inibitore della proliferazione e delle funzioni effettrici linfocitarie (Th1, Th2 e Th17).

In aggiunta agli stimoli non polarizzanti, le cellule vengono trattate con interleuchina 2, per mantenerne la vitalità cellulare, a partire dal giorno 0 fino a giungere al giorno 20, con intervalli costanti di 3 giorni. Durante tutto il corso dell'esperimento è stato osservato l'andamento della crescita delle cellule in coltura effettuando la conta cellulare con metodo di esclusione Trypan Blue. In figura 4.15 si osserva una progressiva amplificazione delle cellule in coltura promossa dal trattamento di non polarizzazione che raggiunge il suo massimo al giorno 12 per poi calare progressivamente fino al giorno 18. Nei giorni 14 e 20 sono stati raccolti i campioni per la valutazione del fenotipo delle cellule analizzate tramite citofluorimetria a flusso, come eseguito precedentemente per i linfociti T CD4+ totali.

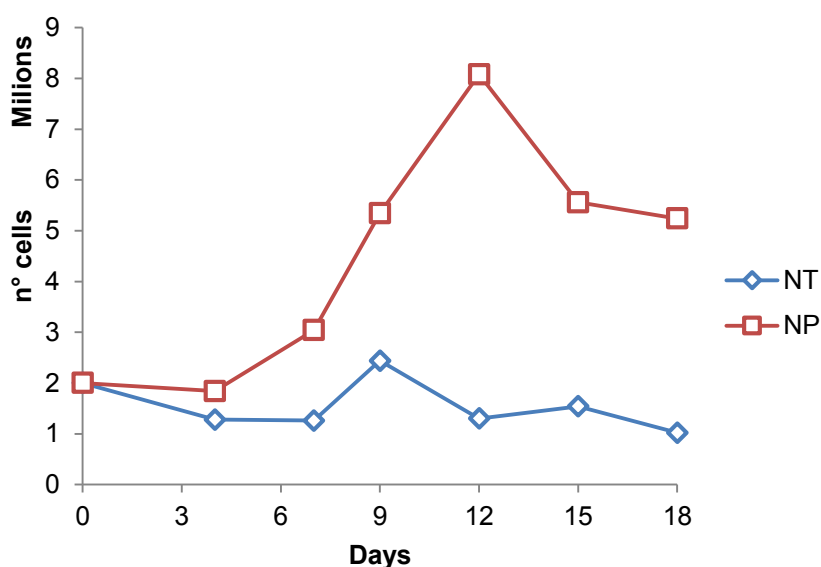


Figura 4.15: Andamento dell'espansione dei linfociti T CD4+ naïve stimolati in condizioni di non polarizzazione.

In figura 4.16 è possibile osservare che, in seguito al trattamento di non polarizzazione, la popolazione di cellule T naïve di partenza cala nel tempo, mentre aumenta la percentuale di cellule che esprime un fenotipo central memory. Le variazioni percentuali dei linfociti T CD4+ effector memory e transitional memory non sono invece significative.

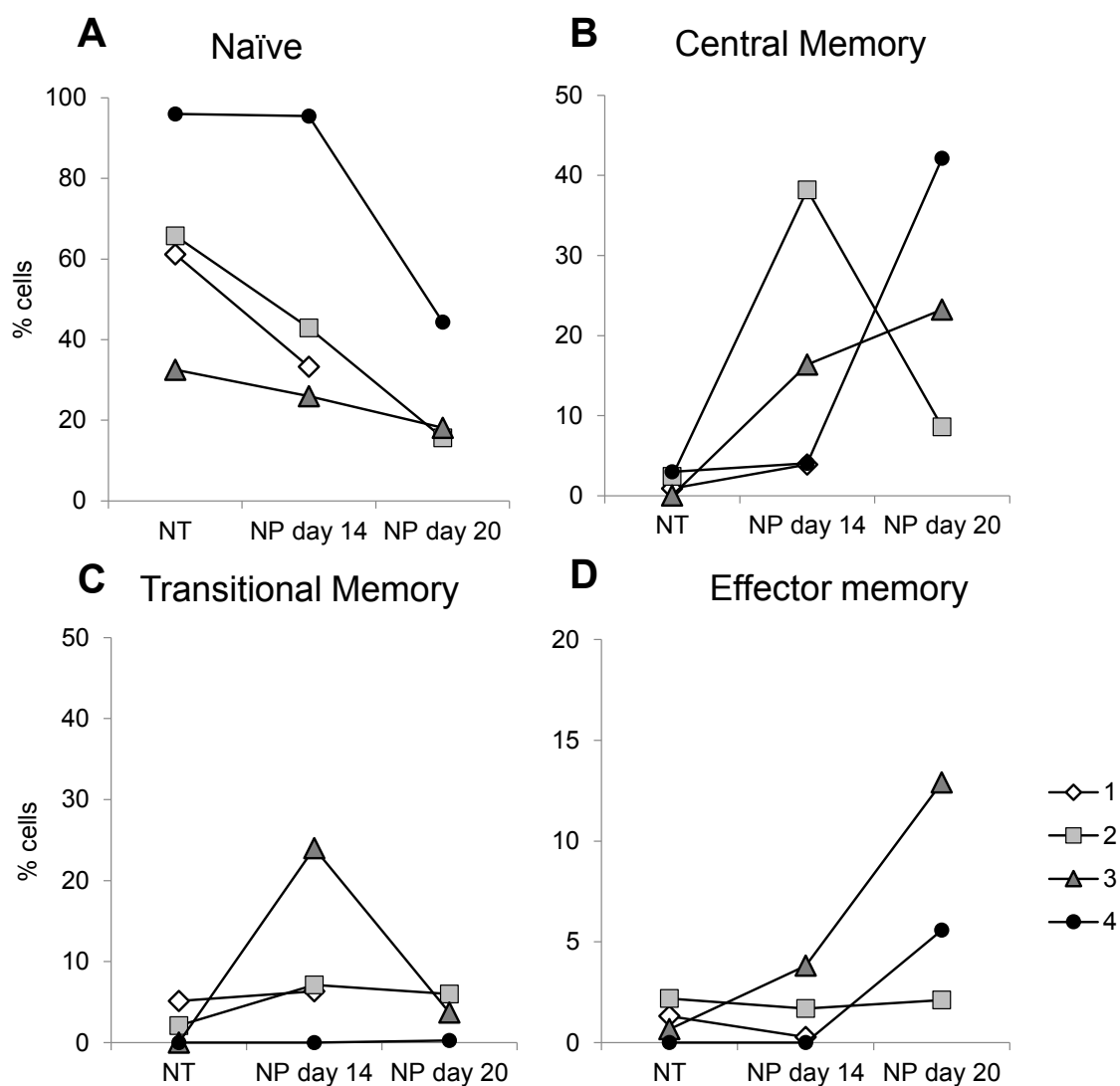


Figura 4.16: Effetto della stimolazione in condizione di non polarizzazione sull'andamento delle diverse sottopopolazioni linfocitarie in 4 differenti donatori (1, 2, 3 e 4), ai giorni 14 e 20 rispetto al controllo non trattato.

Si può quindi concludere che gli stimoli utilizzati per le condizioni di non polarizzazione sembrano indurre un aumento percentuale delle cellule T central memory (figura 4.16 B), suggerendo l'efficienza del modello in vitro nell'indurre una differenziazione delle cellule T CD4+ naïve di partenza verso un fenotipo memoria.

Una volta ottenuta la popolazione di cellule di interesse con le condizioni di non polarizzazione, è stato valutato l'effetto della proteina Tat sulla differenziazione dei linfociti T naïve in central memory e sul loro mantenimento.

La proteina Tat viene aggiunta agli altri stimoli ogni 3 giorni a partire dal giorno 0 fino al giorno 20, in concentrazione di 0,5 µg/ml per 2 milioni di cellule e gli effetti vengono analizzati ai giorni 14 e 20 mediante citofluorimetria a flusso.

La conta cellulare, effettuata con metodo di esclusione Trypan Blue (figura 4.17) evidenzia un'amplificazione delle cellule in coltura modulata dalla presenza di Tat, raggiungendo il picco massimo al giorno 15.

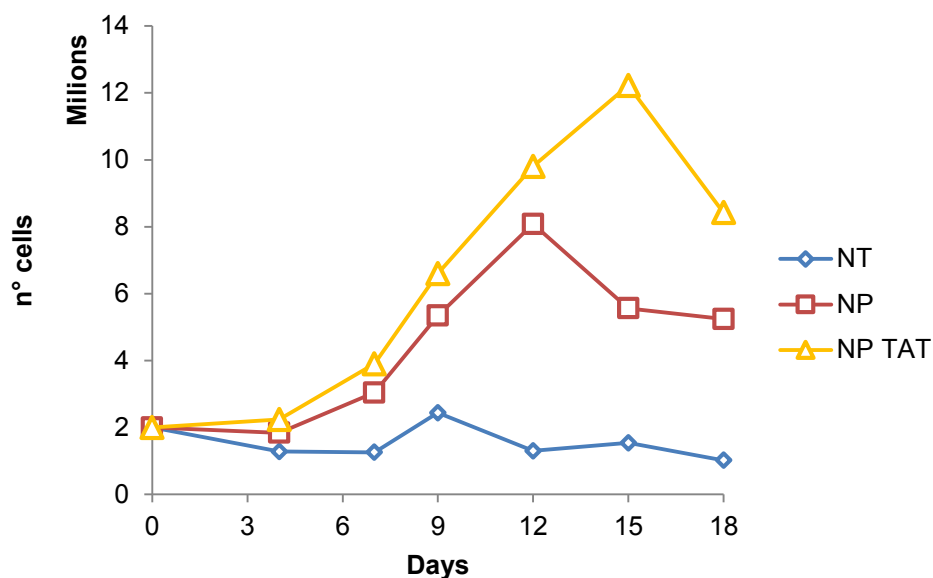


Figura 4.17: Andamento dell'espansione dei linfociti T CD4+ naïve non stimolati (NT) e stimolati in condizione di non polarizzazione, in presenza (NP TAT) o assenza di Tat (NP).

Analizzando la distribuzione delle sottopopolazioni linfocitarie, al giorno 14 non sembra esserci nessun effetto della proteina Tat, mentre risulta evidente un suo effetto al giorno 20 di trattamento (figura 4.18). In particolare si osserva dalla figura un aumento statisticamente significativo della percentuale di cellule esprimenti fenotipo di transitional memory, effector memory ma soprattutto central memory in risposta al trattamento con la proteina Tat.

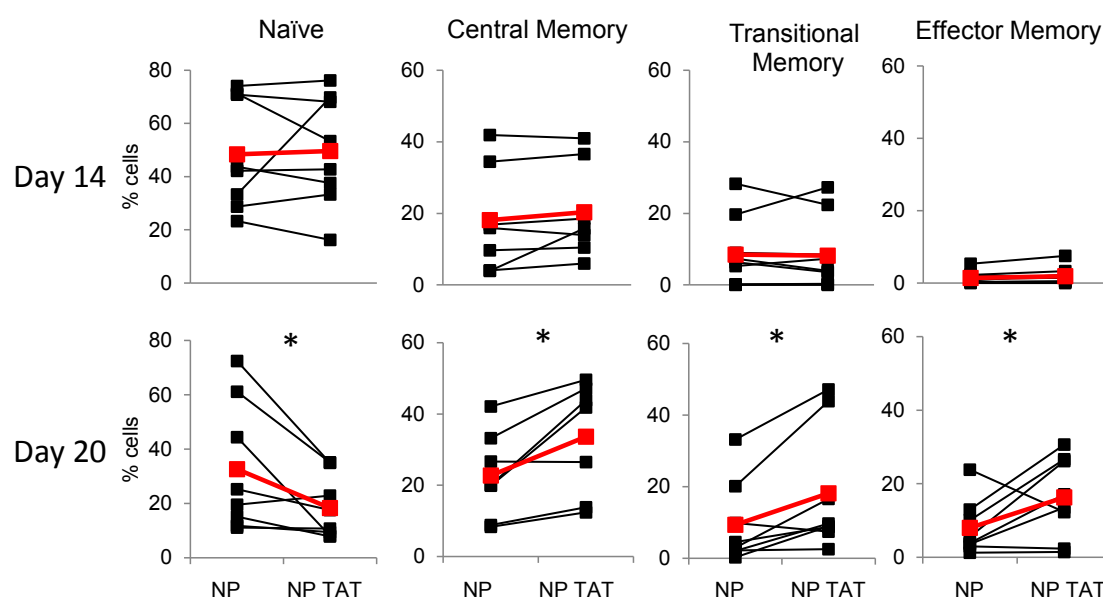


Figura 4.18: Effetto del trattamento di non polarizzazione sulla differenziazione dei linfociti T CD4+ naïve ai giorni 14 e 20. Ogni linea è rappresentativa di un donatore, la linea rossa rappresenta la media dei donatori analizzati. Analisi statistica effettuata utilizzando il Wilcoxon signed-rank test. * $p < 0.05$, $n = 6-8$.

Questi dati sono supportati anche da analisi dell'intensità media di fluorescenza riferita al marker di espressione CD45RA, ottenuta sempre mediante citofluorimetria a flusso (figura 4.19). La somministrazione della sola proteina Tat, induce al giorno 14 un calo di espressione dello stesso marker rispetto alla condizione in assenza di trattamento. Questo effetto risulta essere più evidente se essa viene somministrata in aggiunta al modello di stimolazione in condizioni di non polarizzazione sia al giorno 14 che al giorno 20. In conclusione i dati sembrano suggerire che l'effetto della proteina Tat sia diretto sull'espressione del marker di superficie CD45RA, caratteristico delle cellule in differenziazione.

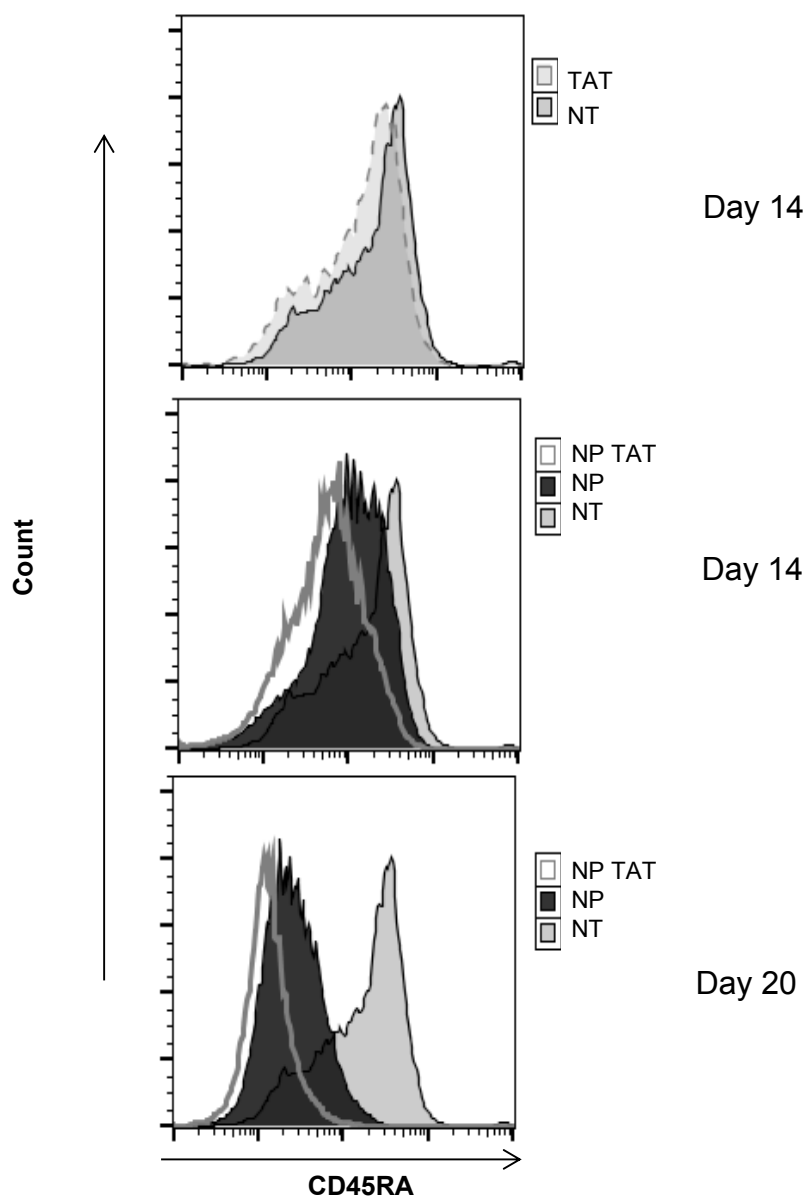


Figura 4.19: Intensità media di fluorescenza del marker di espressione superficiale CD45RA dei linfociti T CD4+ naïve non trattati (NT), trattati con la sola proteina Tat alla dose di 0,5 µg/ml (TAT), stimolati in condizioni di non polarizzazione (NP) e con aggiunta di 0,5 µg/ml di Tat (NP TAT).

LINFOCITI T CD4+ ARRICCHITI IN EFFETTORI

I dati ottenuti mediante le analisi svolte finora sui linfociti T CD4+ naïve, hanno permesso l'ottenimento di risultati in merito all'efficacia del modello non polarizzato e alla conseguente differenziazione linfocitaria verso un fenotipo central memory. Utilizzando questo sistema, è stato possibile osservare che la proteina Tat di HIV-1 ha un effetto sul marker di superficie CD45RA aumentando il differenziamento di cellule T CD4+ naïve.

Confermata l'efficienza del modello, l'attenzione si è indirizzata sulla ricerca di un sistema il più possibile simile alla condizione fisiologica riscontrabile in vivo, in cui le cellule central memory derivano da cellule effector memory e non da linfociti T CD4+ naïve. A questo scopo, sono stati isolati linfociti T CD4+ depleti di naïve e central memory, che sono stati stimolati con la proteina Tat.

Il protocollo sperimentale prevede l'isolamento dei linfociti totali, provenienti da donatori sani, dai quali si purificano i linfociti T CD4+ depleti di T naïve e T central memory, ottenendo quindi una popolazione di linfociti T CD4+ arricchiti in effettori. La popolazione cellulare ottenuta è stata trattata o meno con la proteina Tat alla dose di 0,5 µg/ml ogni tre giorni, ed è stata aggiunta IL2 per garantire la vitalità cellulare. Poichè le cellule prese in esame sono cellule effettrici (effector ed effector memory) e quindi già polarizzate (CD45RA-), non necessitavano di attivazione e quindi non sono stati utilizzati gli stimoli dell'anti CD3-CD28, né gli altri stimoli di non polarizzazione.

Lo studio dei linfociti T CD4+ arricchiti in effettori si è focalizzato in primo luogo sull'espressione delle molecole di superficie CCR7 e CD27, marker identificativi delle sottopopolazioni CCR7+ CD27+ (central memory) e CCR7- CD27+ (transitional memory). L'analisi dei campioni è avvenuta ai giorni 7, 14 e 20. Come si osserva in figura 4.20, la proteina Tat non modifica significativamente le sottopopolazioni central memory e transitional memory in nessuno dei tempi presi in esame.

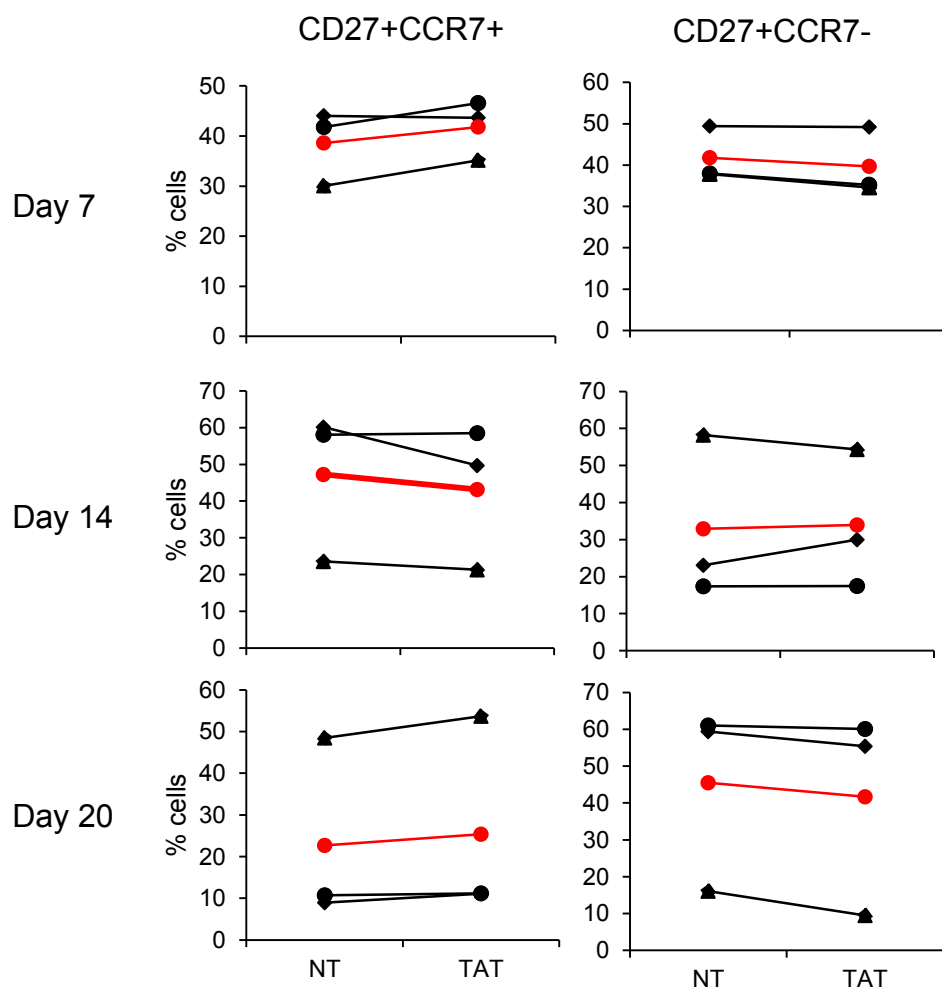


Figura 4.20: Effetto di Tat sulla differenziazione dei linfociti T CD4+ arricchiti in effettori (central memory CD27+CCR7+ e transitional memory CD27+CCR7-), osservato ai giorni 7, 14 e 20. Ogni linea è rappresentativa di un donatore, la linea rossa rappresenta la media dei donatori analizzati.

Questi dati sono supportati anche da analisi dell'intensità di fluorescenza riferita ai marker di espressione CCR7 e CD27 (figura 4.21). La proteina Tat, non produce un effetto significativo sull'espressione dei due marker (CCR7 e CD27) rispetto alla condizione di controllo.

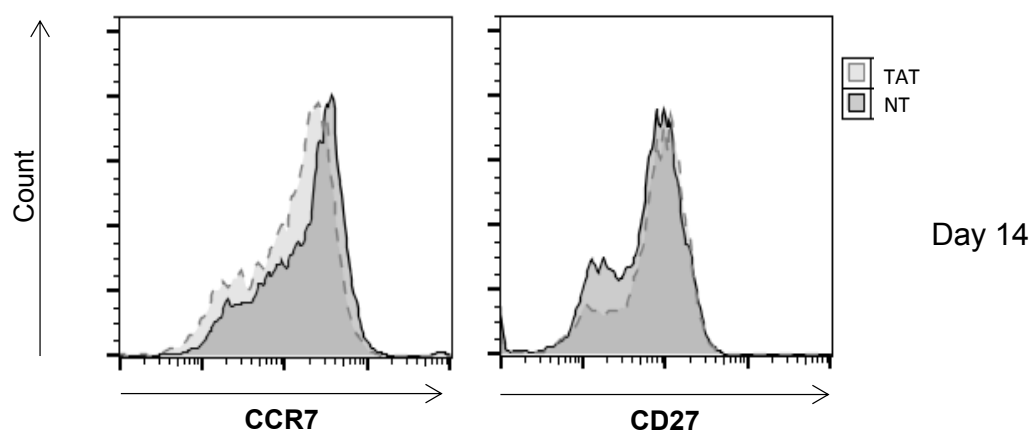


Figura 4.21: Intensità media di fluorescenza dei marker di espressione CCR7 e CD27 dei linfociti T CD4+ depleti di naïve e central memory, non trattati (NT) e trattati con Tat (TAT) al giorno 14.

In questa seconda parte dello studio, è stato valutato l'effetto di Tat sui linfociti T CD4+, andando ad analizzare il loro differenziamento verso un fenotipo memoria, che identifica i target virali di latenza.

L'effetto di Tat è stato valutato dal punto di vista fenotipico, dapprima su PBL totali, poi su colture di CD4+ purificati. L'analisi dei marker fenotipici ha mostrato una tendenza all'aumento percentuale delle cellule con caratteristiche fenotipiche di memoria in risposta al trattamento con Tat (figure 4.9 e 4.10). È stato poi messo a punto un modello di stimolazione, “non polarizzato”, in grado di generare e mantenere in vitro popolazioni omogenee di cellule T CD4+ central memory a partire da linfociti T CD4+ naïve, corrispondenti ai reservoir virali. Su questo modello è stato analizzato l'effetto di Tat nel favorire la transizione verso un fenotipo central memory, e sulla loro vitalità.

I dati ottenuti mostrano che Tat ha un'azione diretta sul marker di espressione CD45RA, e, diminuendone l'espressione nelle cellule trattate (figura 4.19), favorisce quindi il processo di differenziamento delle cellule trattate (figura 4.19). L'analisi della proliferazione cellulare mostra inoltre una maggior vitalità dei linfociti trattati con Tat rispetto ai non trattati, o ai trattati con il solo stimolo di “non polarizzazione” (figura 4.17). Questo effetti si osservano per quanto riguarda la popolazione di partenza delle cellule naïve trattate con gli stimoli di “non polarizzazione”, suggerendo un effetto di Tat nel mantenimento delle cellule central memory. Non si osservano effetti di Tat sul differenziamento e sulla vitalità dei linfociti T CD4+ arricchiti in effettori (figure 4.20 e 4.21).

4.3 VALUTAZIONE PRECLINICA DELL'IMMUNOGENICITA' DELLA PROTEINA TAT E DEL PEPTIDE TAT 1-20

L'utilizzo della proteina Tat come candidato vaccinale, a scopo sia terapeutico che preventivo, sta avendo riscontri positivi sia nella sperimentazione su primati che nei trials clinici di fase I e II sull'uomo. Tuttavia, lo sviluppo di vaccini in grado di indurre risposte protettive deve affrontare alcune sfide importanti, come la compliance richiesta per le vaccinazioni di massa; l'induzione di risposte immunitarie nei tessuti mucosali, che sono i siti predominanti di acquisizione di HIV [21]; e gli isotipi degli anticorpi indotti, che possono influenzare l'efficacia del vaccino [22]. Tutti questi fattori possono essere, almeno in parte, modulati dalla via di somministrazione utilizzata. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che gli anticorpi diretti contro la regione N-terminale di Tat, la più immunogenica in termini di risposte umorali [19, 20], proteggono le scimmie dall'acquisizione dell'infezione [14], suggerendo che il peptide di Tat 1- 20 potrebbe essere un interessante candidato vaccinale.

4.3.1 VALUTAZIONE DI UNA DOSE DIPENDENZA NELL'IMMUNIZZAZIONE CON LA PROTEINA TAT

Per valutare se lo sviluppo di una risposta umorale dopo immunizzazione con la proteina Tat seguisse una dose dipendenza, gruppi di 6 topi Balb/C sono stati immunizzati per via intradermica (ID) con tre dosi di Tat: 30 μ g, 7,5 μ g e 1 μ g ai giorni 1, 14 e 28, secondo il protocollo in figura, i campioni di siero sono stati raccolti al giorno 42 ed analizzati per la presenza di anticorpi (IgG e IgM) anti Tat.

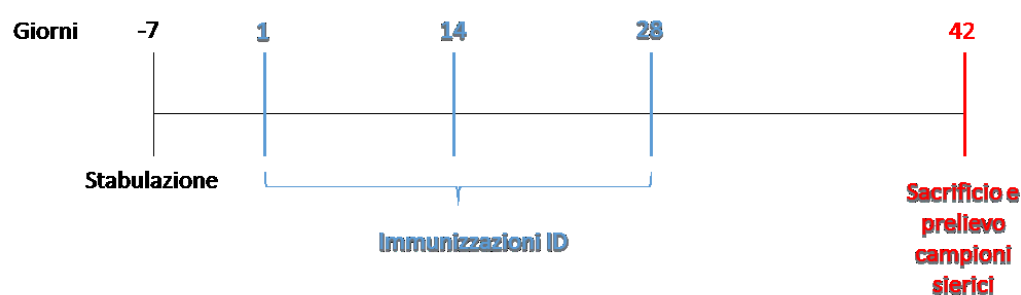


Figura 4.22: Time line del protocollo di immunizzazione effettuato con le dosi di Tat 30 μ g, 7,5 μ g e 1 μ g per via ID, e del prelievo dei campioni analizzati.

Sugli animali sono stati effettuati controlli regolari dello stato di salute e istologici al termine dell'esperimento, i quali non hanno evidenziato alcuna reazione avversa, nè a livello locale nè sistemico della formulazione vaccinale (dati non mostrati).

Come si osserva in figura 4.23, è possibile notare per entrambe le immunoglobuline analizzate, che la dose di 30 μg induce una risposta significativamente più alta rispetto alle dosi di 7,5 e 1 μg . Infatti, sia l'analisi del titolo anticorpale IgG anti- Tat (figura 4.23A), che del titolo IgM anti- Tat (figura 4.23B) mostrano una dose dipendenza nello sviluppo della risposta umorale.

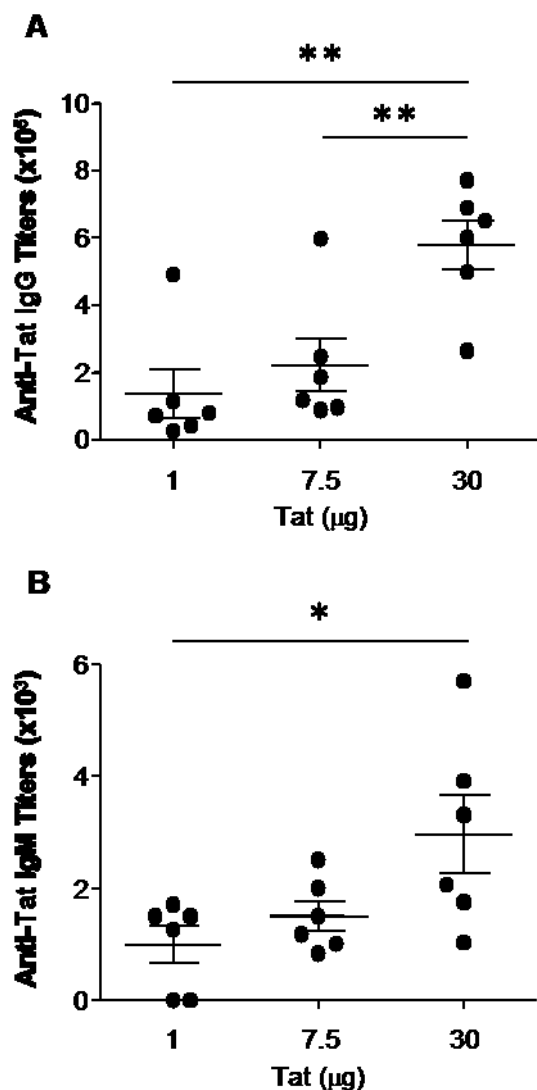


Figura 4.23: Caratterizzazione delle risposte umorali anti Tat nel siero. Al giorno 42 sono stati raccolti campioni sierici di 6 topi per gruppo immunizzati tre volte per via ID con la proteina Tat alla dose di 30, 7,5 or 1 μg , la presenza di IgG e IgM anti Tat è stata valutata tramite Test Elisa. (A) Titolo IgG anti Tat nel siero. (B) Titolo IgM anti Tat nel siero. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.3.2 EFFETTI DELLA VIA DI SOMMINISTRAZIONE SULL'IMMUNOGENICITÀ DELLA PROTEINA TAT

Per valutare gli effetti delle vie di somministrazione sull'immunogenicità della proteina Tat, gruppi di topi sono stati immunizzati con 30 µg di Tat per via intradermica (ID), intramuscolo (IM) o attraverso la mucosa orale (OM), in assenza di adiuvante. La dose di 30 µg è stata scelta grazie agli esperimenti precedentemente descritti.

Le immunizzazioni ID e IM hanno previsto l'inoculo del vaccino in due dosi di 250µl di volume in due siti del dorso, mentre per la via OM, gli animali hanno ricevuto il volume di 500 µl attraverso la mucosa orale. Come indicato in figura, gli animali sono stati immunizzati al giorno 1, 14 e 28 per via ID, IM e OM. I campioni di siero, dei lavaggi vaginali e intestinali sono stati raccolti al giorno 42 e analizzati per la presenza di anticorpi anti Tat tramite test ELISA.

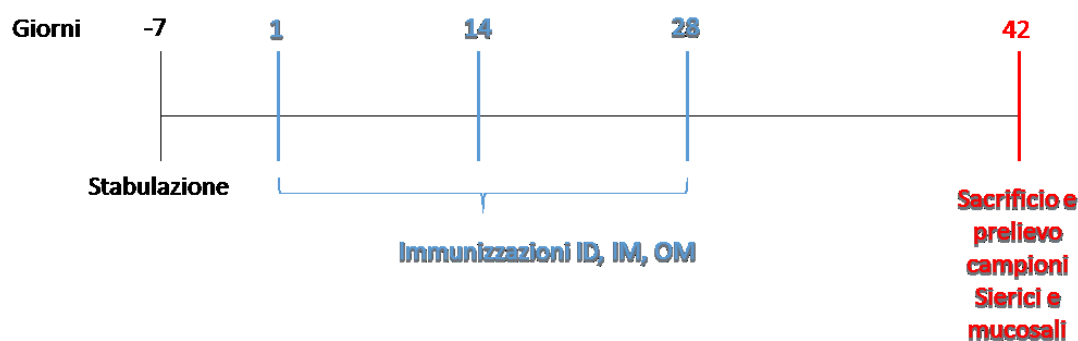


Figura 4.24: Time line del protocollo di immunizzazione effettuato con Tat 30µg, per via ID, Im e OM e del prelievo dei campioni analizzati.

Come mostrato in figura 4.25A, anticorpi IgG anti-Tat sono risultati presenti nel siero di tutti gli animali con titoli anticorpali paragonabili tra i gruppi (figura 4.25 B). Al contrario, anticorpi IgM anti-Tat sono presenti nel siero a livelli comparabili per tutti i topi immunizzati per via IM o ID, ma non negli animali immunizzati per via OM (figura 4.25 A-C). È interessante notare che la via OM è l'unica via di somministrazione in grado di indurre anticorpi IgA anti-Tat nel siero nell'80% dei topi vaccinati, come si osserva in figura 4.25A e D.

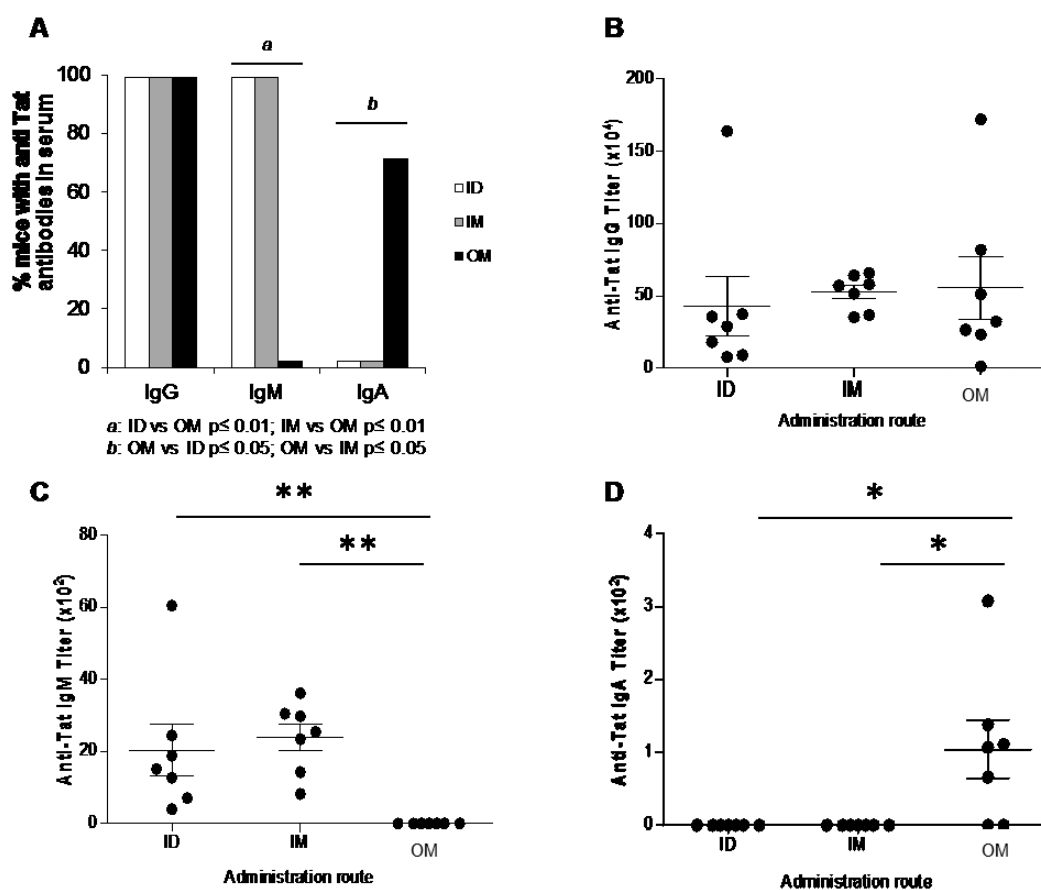


Figura 4.25: Caratterizzazione delle risposte umorali anti Tat nel siero. Al giorno 42 sono stati raccolti campioni sierici di 7 topi per gruppo immunizzati per via ID, IM o OM con la proteina Tat, la presenza di IgG, IgM e IgA anti Tat è stata valutata tramite Test Elisa. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti rispettivamente da tre e quattro animali. (A) Percentuali di topi che sviluppano IgG, IgM e IgA anti Tat nel siero. (B) Titolo IgG anti Tat nel siero. (C) Titolo IgM anti Tat nel siero. (D) Titolo IgA anti Tat nel siero. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. I punti rappresentano il singolo topo e le linee la media \pm SEM.

Per determinare come l'immunizzazione con la proteina Tat fosse in grado di sviluppare anticorpi nelle secrezioni mucosali, sono state quindi valutate le risposte umorali anti-Tat nei lavaggi vaginali e intestinali dei topi vaccinati. Come mostrato in figura 4.26 A, l'immunizzazione per via OM non è in grado di indurre IgG anti-Tat nelle secrezioni vaginali, che sono rilevabili soltanto in alcuni animali immunizzati per via ID e IM (figura 4.26 B). Si nota invece che le diverse vie di somministrazione non evidenziano differenze significative in termini di risposta IgA per quanto riguarda l'immunità a livello della mucosa vaginale (figura 4.26 C). L'analisi dei lavaggi intestinali mostra che le vie di somministrazione ID e IM sono in grado di indurre titoli anticorpali IgG anti Tat più alti rispetto alla via OM (figura 4.26 D-E), mentre è interessante notare che solo la via OM induce IgA anti-Tat nelle mucose intestinali (figura 4.26 D - F, $p < 0.05$).

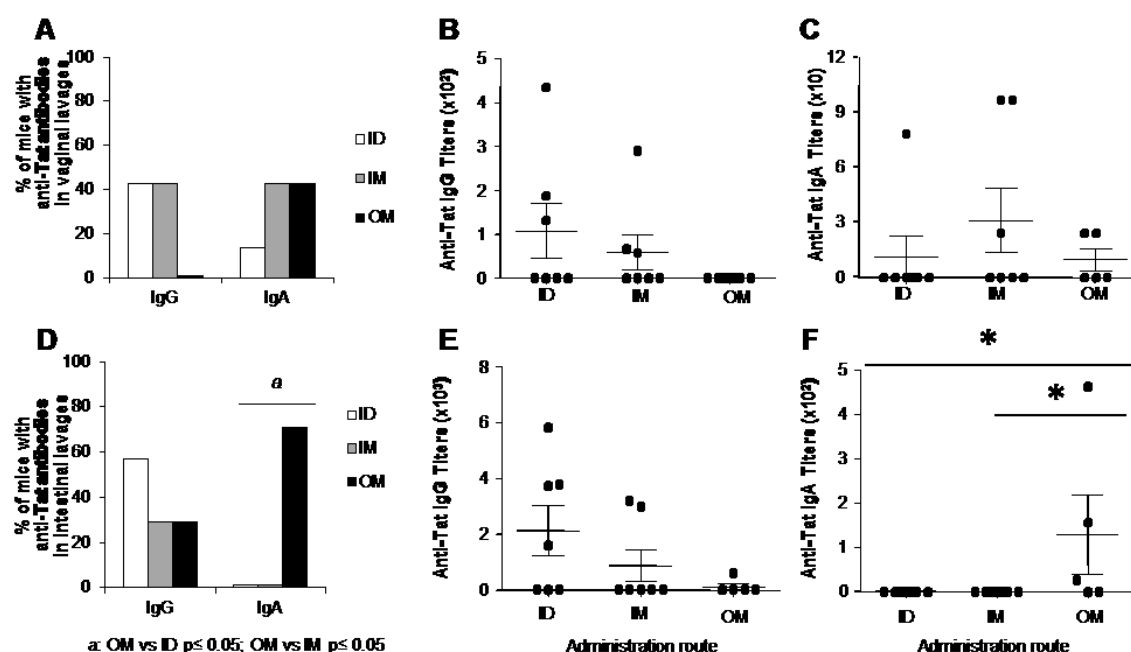


Figura 4.26: Caratterizzazione delle risposte umorali anti Tat nei lavaggi mucosali. Al giorno 42 sono stati raccolti campioni sierici di 7 topi per gruppo immunizzati per via ID, IM o OM con la proteina Tat, la presenza di IgG e IgA anti Tat è stata valutata tramite test Elisa. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti rispettivamente da tre e quattro animali. (A) Percentuale di topi che sviluppano IgG e IgA anti Tat nei lavaggi vaginali. (B) Titolo IgG anti Tat nei lavaggi vaginali. (C) Titolo IgA anti Tat nei lavaggi vaginali. (D) Percentuale di topi che sviluppano IgG e IgA anti Tat nei lavaggi intestinali. (E) Titolo IgG anti Tat nei lavaggi intestinali. (F) Titolo IgA anti Tat nei lavaggi intestinali. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. I punti rappresentano il singolo topo e le linee la media \pm SEM.

In conclusione questi dati mostrano che la via di somministrazione OM genera risposte IgA anti-Tat più elevate rispetto alle vie ID e IM, sia a livello sierico che nei lavaggi mucosali, ma risulta meno efficiente nel generare risposte anti-Tat IgM nel siero e IgG nelle mucose. Si può inoltre dedurre che l'immunogenicità di Tat è comparabile quando somministrata ID e IM.

4.3.3 EFFETTI DELLA VIA DI SOMMINISTRAZIONE SULL'IMMUNOGENICITÀ DI UN VACCINO PEPTIDICO BASATO SULLA PROTEINA TAT

Per determinare come le diverse vie di somministrazione possano influenzare l'immunogenicità umorale di vaccini peptidici, sono stati immunizzati topi per via ID o OM

con il peptide immunodominante di Tat 1-20 alla dose di 7 μ g. Questa dose è stata scelta poichè contiene lo stesso numero di molecole di 30 μ g di proteina Tat, dose utilizzata negli esperimenti precedenti. Le immunizzazioni sono state effettuate ai giorni 1, 14 e 28, mentre i campioni sierici e mucosali sono stati raccolti al giorno 42 per quantificare le risposte umorali sistemiche contro il peptide Tat 1-20, come si può osservare in figura 4.27.

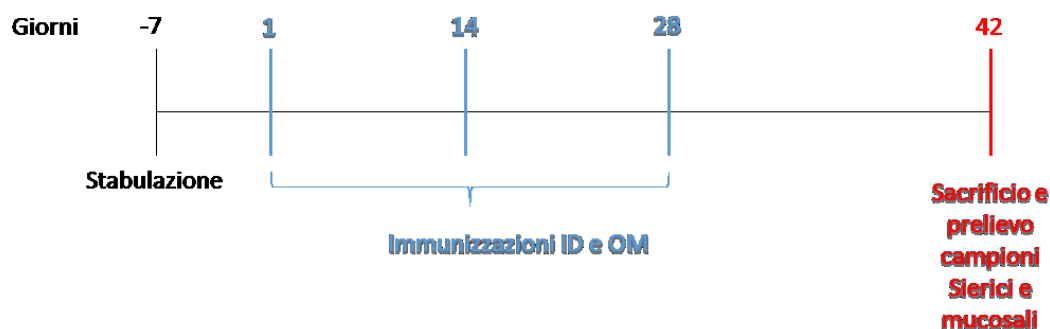


Figura 4.27: Time line del protocollo di immunizzazione effettuato con Tat 30 μ g, e Tat 1-20 7 μ g, e del prelievo dei campioni analizzati.

In figura 4.28 A-B, si può notare che anticorpi IgG sono quasi assenti negli animali vaccinati con il peptide Tat 1-20, indipendentemente dalla via di somministrazione, mentre sono rilevabili in tutti i topi vaccinati con la proteina Tat intera (figura 4.28 A). IgA anti-Tat 1-20 sono assenti in tutti i gruppi mentre, come osservato in precedenza, IgM anti-Tat 1-20 sono presenti a frequenza più alta negli animali immunizzati ID piuttosto che OM, anche se le differenze non risultano statisticamente significative (figura 4.28 A-C).

In conclusione, questi ultimi risultati mostrano che l'immunizzazione con la proteina Tat intera è più efficace nell'ottenere una risposta umorale diretta contro la sua porzione peptidica immunodominante Tat 1-20.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo studio è stato l'identificazione del ruolo della proteina Tat in diversi aspetti dell'infezione da HIV. In particolare è stata valutata la sua capacità di aumentare i target di infezione, attraverso l'attivazione dei linfociti T CD4+, e di favorire la latenza, agendo sulla generazione e il mantenimento dei *reservoir* di HIV.

E' stata effettuata un'analisi degli effetti della proteina Tat sull'attivazione cellulare e sull'espressione di alcuni importanti fattori di trascrizione dei linfociti T CD4+. L'analisi ha previsto due condizioni di coltura: uno stato quiescente, ed uno stato di attivazione, per studiare se Tat favorisca l'attivazione, la differenziazione e la sopravvivenza dei linfociti T CD4+.

Sono stati dapprima analizzati gli effetti di Tat sull'attivazione funzionale dei linfociti T CD4+, e i risultati ottenuti mostrano che la proteina aumenta il rilascio delle citochine IL2 e IFN γ nei linfociti T CD4+ attivati con anti CD3/CD28 (figura 4.2), mentre non ha nessun effetto sui linfociti T CD4+ in assenza di stimoli di attivazione (figura 4.1).

Per confermare ulteriormente i risultati ottenuti, sono stati valutati marker di espressione indicativi dello stato di attivazione dei linfociti T CD4+: CD25, la catena alfa del recettore dell'IL2, la cui produzione è modulata dalla proteina Tat, HLA-DR e CD38, entrambi correlati con una più veloce progressione dell'AIDS e indicatori di immunoattivazione cronica. Contrariamente a quanto suggerito dai dati precedenti, l'analisi fenotipica, condotta su linfociti CD4+ purificati e trattati o meno con Tat in presenza e in assenza degli stimoli di attivazione CD3/CD28, ha indicato che Tat non agisce sull'espressione di questi marcatori (figura 4.6).

Non si osservano effetti di Tat sulla proliferazione cellulare di linfociti T CD4+ resting e attivati. Tuttavia, è interessante osservare che Tat favorisce la sopravvivenza dei linfociti totali quando coltivati in assenza di stimoli di crescita (figura 4.4). Lo studio del programma trascrizionale ha confermato che Tat è in grado di potenziare la stimolazione dei linfociti T CD4+ aumentando l'espressione di fattori di trascrizione importanti per le funzioni effettrici delle cellule come T-Bet, Eomes e Blimp-1, e del fattore anti apoptotico Bcl-2. L'espressione di questi fattori non è aumentata da Tat nei linfociti T CD4+ resting (figura 4.7).

T-bet è un fattore di trascrizione responsabile della differenziazione dei linfociti T in Th1

[18,19], e la sua up-regolazione in cellule stimulate in seguito al trattamento con Tat conferma la capacità di Tat di aumentare lo stato di attivazione dei linfociti T CD4+. Eomes è coinvolto nella differenziazione delle cellule T durante la risposta immunitaria regolando la produzione dell'IFN- γ : a ulteriore conferma dell'effetto di Tat sul rilascio della citochina nei linfociti T CD4+ attivati, si osserva infatti anche la up-regolazione di Eomes in risposta al trattamento con Tat. Bcl-2 controlla l'apoptosi e ha la funzione di prevenirla, il suo aumento dopo trattamento con Tat potrebbe indicare un coinvolgimento nella sopravvivenza delle cellule T CD4+. Un altro fattore trascrizionale cruciale per l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T sia CD4+ che CD8+ è Blimp-1. Blimp-1 è un fattore codificato da Prdm1, attivato da IL2 e correlato a funzioni effettrici e memoria in CD4+ e CD8+ [19-21].

E' stato, inoltre, valutato il profilo trascrizionale dei linfociti T CD4+ quiescenti trattati con Tat per 24 ore. A questa tempistica si nota una down-regolazione dell'espressione dei geni Eomes e Blimp-1 mediata da Tat (figura 4.8). Molto interessante è l'effetto opposto di Tat sull'espressione di Blimp-1 nei linfociti T CD4+ attivati e nei resting. Blimp-1 è un importante fattore coinvolto nella differenziazione dei linfociti B e T. Studi recenti hanno dimostrato che questa molecola è espressa diversamente durante il corso delle infezioni virali, incluso HIV, e livelli appropriati di Blimp-1 sono necessari per il controllo virale e per evitare l'esaurimento delle cellule T. In particolare, è stata riportata una correlazione inversa tra l'espressione di Blimp-1 in cellule B memoria attivate e il titolo virale in individui sieropositivi, suggerendo che bassi livelli di Blimp-1 nei linfociti B siano associati con la progressione della malattia [156]. Studi precedenti mostrano che l'induzione di Blimp-1 in cellule CD4+ memoria potrebbe ridurre i *reservoir* virali [130], quindi, alti livelli di Blimp-1 sembrano essere associati, sia nei linfociti T CD4+ che nei B, con una lenta o assente progressione verso l'AIDS. Uno studio sull'intera popolazione CD4+ di individui sieropositivi riporta livelli più alti di Blimp-1 nei progressors rispetto ai non progressors e ai controlli sani, questo suggerisce che Blimp-1 sia diversamente espresso nel corso dell'infezione da HIV in accordo con lo stato di attivazione delle cellule e lo stato di progressione della malattia negli individui infetti [160]. Non si può escludere che questa differente espressione possa risultare in un doppio ruolo di Blimp-1 nella progressione di HIV [157-159].

E' stato recentemente dimostrato che la proteina Tat di HIV induce un'over espressione di Blimp-1 nei CD8 attivati ma non nei resting [67]. I risultati di questo studio mostrano che Tat influenza l'espressione di Blimp-1 anche nei linfociti T CD4+, attivati e resting ed è noto

che Tat up regola, sia nei CD4 attivati che nei CD8, il rilascio di IL2 che è un induttore di Blimp-1.

Per analizzare il ruolo di Tat nella generazione e nel mantenimento dei *reservoir* virali, è stato valutato il suo effetto sul differenziamento dei linfociti T CD4+ verso cellule con caratteristiche di memoria, quindi *reservoir* di HIV. E' stato prima di tutto analizzato l'effetto della proteina sul fenotipo, andando a valutare marker indicatori di cellule memoria come CD62L, CD44, CCR7, CD45RA e CD127. Il CD62L e il CCR7 sono marker di homing linfocitario, e la loro coespressione con il CD44 indica un fenotipo memoria nei linfociti CD4+. Il CD45RA è un marker di differenziamento, utilizzato per discriminare le cellule naïve da quelle attivate, mentre il CD127 è il recettore dell'interleuchina 7, citochina coinvolta nello sviluppo e nel differenziamento dei linfociti T CD4+ memoria.

Dai risultati ottenuti trattando con la proteina Tat sia linfociti totali che CD4+ purificati in assenza di altri stimoli di attivazione, si osserva un aumento percentuale di marker che indicano un fenotipo memoria, suggerendo un effetto di Tat nella differenziazione dei linfociti T CD4+, anche se non statisticamente significativo (figure 4.9 e 4.10).

Successivamente, è stata eseguita un'analisi più approfondita dal punto di vista fenotipico per identificare le sottopopolazioni di linfociti T CD4+ memoria e in particolare i linfociti T CD4+ naïve, effector memory, transitional memory e central memory, con e senza trattamento con la proteina Tat, (figura 4.12) [11]. I risultati ottenuti mostrano un aumento percentuale della sottopopolazione central memory, in contemporanea a un calo delle cellule CD4+ naïve, confermando i dati ottenuti dai trattamenti precedenti (figura 4.13). Non si osservano invece effetti sulla vitalità cellulare in risposta al trattamento con Tat.

Per valutare in maniera più precisa l'effetto di Tat sulla transizione dei linfociti T CD4+ a linfociti T CD4+ central memory, ovvero *reservoir* di HIV, è stato messo a punto un modello di stimolazione in vitro, che ha previsto l'utilizzo di diversi stimoli per portare le cellule naïve di partenza a central memory [10], e su queste valutare l'effetto della proteina Tat. I dati ottenuti mostrano che il modello di stimolazione utilizzato (non polarizzazione) [10] è efficiente nell'indurre la differenziazione dei linfociti T CD4+ naïve in linfociti T CD4+ central memory ed effector memory (figura 4.16). E' inoltre evidente un effetto sulla vitalità cellulare, in confronto ai linfociti coltivati con la sola aggiunta di IL2 (figura 4.15).

Dalle analisi sui linfociti T CD4+ naïve si può quindi concludere che Tat abbia un effetto sul loro differenziamento, agendo direttamente sul marker di espressione CD45RA, e

portando ad un aumento statisticamente significativo della percentuale di cellule esprimenti fenotipo di transitional memory, effector memory ma soprattutto central memory (figura 4.18). Molto interessante è l'effetto sulla vitalità cellulare, che indica una azione della proteina Tat nel mantenimento dei linfociti T CD4⁺ con caratteristiche di memoria, quindi potenziali *reservoir* di HIV (figura 4.19).

Da ultimi sono stati analizzati i linfociti T CD4⁺ depleti di naïve e central memory, una popolazione quindi formata da cellule con caratteristiche prevalenti di effettori (figure 4.20 e 4.21). L'analisi su questi linfociti sembra confermare i dati ottenuti dai trattamenti sulle cellule naïve, in cui la differenziazione dei linfociti di partenza in risposta al trattamento con Tat è motivata da un effetto della proteina sul marker CD45RA.

L'effetto di Tat nell'aumento dell'attivazione è di grande interesse nel contesto dell'infezione da HIV, poiché aumentando i linfociti T CD4⁺ attivati, aumentano i target di infezione per il virus e quindi lo spread virale. In particolare, il doppio effetto di Tat sull'espressione di Blimp-1 ed Eomes nei linfociti T CD4⁺ attivati e nei resting, oltre a confermare il suo ruolo nell'aumento dell'attivazione, lascia suggerire un suo coinvolgimento anche nel favorire la latenza di HIV, poiché alti livelli di Blimp-1 sono associati a minori *reservoir* [130]. Molto interessanti sono i risultati ottenuti dal trattamento con Tat dei linfociti T CD4⁺ naïve non polarizzati, poiché un aumento della vitalità cellulare in risposta al trattamento con Tat, suggerisce un suo effetto sul mantenimento delle cellule central memory. I dati fenotipici sul differenziamento dei linfociti T CD4⁺ verso un fenotipo memoria, suggeriscono un effetto di Tat sulla generazione dei *reservoir* virali, ma ulteriori studi saranno necessari per confermare l'effetto della proteina nel differenziamento cellulare.

In conclusione i dati ottenuti mostrano che Tat ha un effetto nell'aumentare l'infezione di HIV, agendo sull'attivazione dei linfociti T CD4⁺ attivati, e sembra favorire il mantenimento del virus in latenza attraverso il mantenimento dei linfociti T CD4⁺ memoria. Questi meccanismi coinvolgono diversi fattori, in particolare evidente è il doppio ruolo di Blimp-1 in risposta al trattamento con Tat nelle diverse popolazioni cellulari analizzate.

Sulla base di questi risultati, si può supporre che una risposta immune anti Tat in soggetti HIV positivi, possa quindi avere effetti di rilievo nel contenere gli aspetti dell'infezione. Infatti, risultati sul trial clinico di fase II mostrano che risposte immuni anti Tat sono importanti per ripristinare l'omeostasi del sistema immune e l'efficienza delle risposte antivirali necessarie per attaccare il virus in latenza all'interno dei *reservoir*, confermando Tat come opzione promettente nell'intensificare gli effetti della terapia HAART [161].

Secondo obiettivo dello studio è stato quello di caratterizzare l'impatto della via di somministrazione nel generare una risposta anticorpale anti- Tat e anti- Tat 1-20 efficiente.

Per caratterizzare l'incidenza della via di somministrazione nell'indurre una risposta umorale a livello sia sistemico che mucosale, sono state paragonate le immunizzazioni per via intradermica, intramuscolo e attraverso la mucosa orale sia della proteina Tat che del suo peptide immunodominante Tat 1-20, in assenza di adiuvante.

In accordo con quanto precedentemente descritto [135,127,136,137], i risultati mostrano che sia l'immunizzazione mucosale che sistemica con la proteina Tat sono sicure e immunogeniche. La somministrazione IM e ID di Tat sono tra loro paragonabili per distribuzione e titolo degli anticorpi indotti. Un assetto di risposta umorale differente è osservato per la via OM, che risulta incapace di generare IgM anti- Tat nel siero e IgG anti-Tat nelle mucose, ma mostra i migliori risultati in termini di induzione di IgA anti-Tat. Le differenze tra le immunizzazioni ID e OM sono inoltre confermate dall'immunizzazione con il peptide immunodominante di Tat 1-20, che risulta molto meno immunogenico della proteina Tat intera.

La presenza di IgM e IgG anti-Tat nel siero è stata dimostrata essere importante e correlare con una lenta o con nessuna progressione verso lo sviluppo dell'AIDS [138-143]. La somministrazione della proteina Tat per via OM si è rivelata capace di indurre una risposta IgG efficiente nel siero, ma non è stata in grado di indurre IgM. Nonostante l'immunizzazione orale sia in generale considerata la meno immunogenica tra le immunizzazioni sistemiche [144,145], alcuni studi hanno dimostrato che la somministrazione orale di antigeni in grado di legarsi alla superficie delle mucose, induce forti risposte immunitarie [146]. È noto che la proteina Tat è in grado di legarsi tramite la sua regione basica agli eparan solfati e ai proteoglicani presenti nella matrice extracellulare e sulle membrane cellulari [147,148], inoltre, attraverso il suo dominio RGD, alle integrine presenti sulla superficie cellulare delle cellule presentanti l'antigene professionali [149]. Queste proprietà di legame della proteina Tat possono spiegare la sua elevata immunogenicità quando somministrata per via orale, immunogenicità che può essere ulteriormente potenziata dall'utilizzo di adiuvanti vaccinali appropriati, o protocolli di immunizzazione differenti [150,151]. Infatti, data la sua capacità di indurre risposte mucosali importanti [147], la somministrazione orale può essere di particolare interesse per lo sviluppo di vaccini contro HIV/AIDS, che si trasmette principalmente attraverso le mucose [152]. Tuttavia, alcuni problemi devono ancora essere risolti nel campo dei vaccini mucosali.

E' interessante sottolineare che, i dati dello studio di fase 3 del vaccino RV144 suggeriscono che la presenza di IgA sieriche possano annullare l'efficacia conferita dalla presenza di IgG nel siero, anche se le risposte nei siti delle mucose non sono state indagate [104,105]. Inoltre, non è ancora chiaro se risposte immunitarie ottimali a livello delle mucose si ottengano da vaccini somministrati per via mucosale, o da vaccinazioni sistemiche che inducono forti risposte nei siti mucosali.

In conclusione, questo studio dimostra che la somministrazione IM della proteina Tat induce risposte umorali paragonabili a quelle ottenute con la somministrazione ID. Inoltre, è stata testata la vaccinazione orale, un'opzione promettente che necessita di ulteriori studi per migliorare la sua efficienza, soprattutto a livello di formulazione, in seguito alla chiarificazione del ruolo delle IgA sieriche nella protezione dall'acquisizione e nella progressione verso l'AIDS.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1], Abul K. Abbas, *Immunologia cellulare e molecolare* ed Elsevier Masson, 2010.
- [2] Abbas, L.a.P., *Cellular and Molecular Immunology*. Seventh ed. 2011.
- [3] Paul, W.E., *Fundamental Immunology*. Sixth ed. 2008.
- [4] Fietta, P. and G. Delsante, *The effector T helper cell triade*. Riv Biol, 2009.
- [5] Paul, W.E. and R.A. Seder, h. Cell, 1994.
- [6] Zhu, J. and W.E. Paul, h. Blood, 2008.
- [7] Hymowitz, S.G., et al., *IL-17s adopt a cysteine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding*. EMBO J, 2001.
- [8] van Leeuwen, E.M., et al., *Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells*. Curr Opin Immunol, 2009. 21(2): p. 167-72.
- [9] Danahue DA, Wainberg MA. *Cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of HIV-1 latency*. Retrovirology 2013; 10:11
- [10] Bosques A., et al., *Studies of HIV-1 latency in an ex vivo model that uses primary central memory T cells*. Methods 2011; 53:54-61.
- [11] Chomont N, et al., *HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation*. Nature Medicine 2009. 15:893-900
- [12] *Immunologia*, Peter Parham, ed Zanichelli, 2001.
- [13] Meuer, S.C., et al., *The human T-cell receptor*. Annu Rev Immunol, 1984. 2: p. 23-50.
- [14] Alegre, M.L., et al., *T-cell regulation by CD28 and CTLA-4*. Nat Rev Immunol, 2001. 1(3): p. 220-8.
- [15] Nagel, T., et al., *Regulation of T-cell activation by CD28 and CTLA-4*. Med Klin (Munich), 1998. 93(10): p. 592-7.
- [16] Boulougouris, G., et al., *Positive and negative regulation of human T cell activation mediated by the CTLA-4/CD28 ligand CD80*. J Immunol, 1998. 161(8): p. 3919-24.
- [17] Trimble, L.A., et al., *CD3zeta and CD28 down-modulation on CD8 T cells during viral infection*. Blood, 2000. 96(3): p. 1021-9.
- [18] Zhuang, Y., et al., *A continuous T-bet expression is required to silence the interleukin-4-producing potential in T helper type 1 cells*. Immunology, 2009. 128(1): p. 34-42.
- [19] Amsen, D., et al., *How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made?* Curr Opin Immunol, 2009. 21(2): p. 153-60.

- [20] Powell, J.D. and G.M. Delgoffe, *The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism*. Immunity, 2010. 33(3): p. 301-11.
- [21] Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2002. 3(6): p. 549-57.
- [22] Ichii, H., et al., *Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8+ T cells*. Nat Immunol, 2002. 3(6): p. 558-63.
- [23] Ravetch V.J. And Lanier L.L, *Immune Inhibitory Receptors*, Science, 290:84-89, 2000.
- [24] UNAIDS report on the global AIDS epidemic | 2012, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).
- [25] Ruelas, D.S. and W.C. Greene, *An integrated overview of HIV-1 latency*. Cell, 2013. 155(3): p. 519-29
- [26] Harari, A., et al., *Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy*. Blood, 2004. 103(3): p. 966-72.
- [27] Migueles, S.A., et al., *Defective human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell polyfunctionality, proliferation, and cytotoxicity are not restored by antiretroviral therapy*. J Virol, 2009. 83(22): p. 11876-89.
- [28] Trautmann, L., et al., *Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction*. Nat Med, 2006. 12(10): p. 1198-202.
- [29] Catalfamo, M., et al., *CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7*. J Immunol, 2011. 186(4): p. 2106-16.
- [30] Finkel, T.H., et al., *Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes*. Nat Med, 1995. 1(2): p. 129-34.
- [31] Groux, H., et al., *Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals*. J Exp Med, 1992. 175(2): p. 331-40.
- [32] Champagne, P., et al., *Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes*. Nature, 2001. 410(6824): p. 106-11.
- [33] van Baarle, D., et al., *Failing immune control as a result of impaired CD8+ T-cell maturation: CD27 might provide a clue*. Trends Immunol, 2002. 23(12): p. 586-91.
- [34] Roos, M.T., et al., *Changes in the composition of circulating CD8+ T cell subsets during acute Epstein-Barr and human immunodeficiency virus infections in humans*. J Infect Dis, 2000. 182(2): p. 451-8.

- [35] Haas, A., K. Zimmermann, and A. Oxenius, *Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection*. J Virol, 2011. 85(23): p. 12102-13.
- [36] Papagno, L., et al., *Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection*. PLoS Biol, 2004. 2(2): p. E20.
- [37] Gottlieb, M.S., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. N Engl J Med, 1981.
- [38] Philpott, S.M., *HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression*. Curr HIV Res, 2003.
- [39] Pantaleo, G., et al., *Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection*. Immunol Rev, 1994.
- [40] Schweneker, M., et al., *HIV-induced changes in T cell signaling pathways*. J Immunol, 2008.
- [41] Ladell, K., et al., *Central memory CD8+ T cells appear to have a shorter lifespan and reduced abundance as a function of HIV disease progression*. J Immunol, 2008.
- [42] Kaufmann, D.E., et al., *Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction*. Nat Immunol, 2007.
- [43] Catalfamo, M., et al., *HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008.
- [44] Lempicki, R.A., et al., *Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000.
- [45] Groux, H., et al., *Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals*. J Exp Med, 1992.
- [46] Hasley, R.B., et al., *HIV immune activation drives increased Eomes expression in memory CD8 T cells in association with transcriptional downregulation of CD127*. AIDS, 2013.
- [47] Haas, A., K. Zimmermann, and A. Oxenius, *Antigen-dependent and -independent mechanisms of T and B cell hyperactivation during chronic HIV-1 infection*. J Virol, 2011.
- [48] Lisco, A., C. Vanpouille, and L. Margolis, *War and peace between microbes: HIV-1 interactions with coinfecting viruses*. Cell Host Microbe, 2009.
- [49] Brenchley, J.M., et al., *Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection*. Nat Med, 2006.

- [50] Neri, F., et al., *The HIV-1 Nef protein has a dual role in T cell receptorsignaling in infected CD4+ T lymphocytes*. Virology, 2011.
- [51] Mischiati, C., et al., *Extracellular HIV-1 Tat protein differentially activates the JNK and ERK/MAPK pathways in CD4 T cells*. AIDS, 1999.
- [52] Matthew J. Pace, Luis Agosto, Erin H. Graf, Una O'Doherty. *HIV reservoirs and latency models*. Review Virology 2011.
- [53] Ford, E.S., C.E. Puronen, and I. Sereti, *Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. 4(3): p. 206-14.
- [54] Frankel, A.D. and C.o. Pabo, *Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus*. Cell, 1988.
- [55] Tyagi, M., et al., *Internalization of HIV-1 Tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans*. J Biol Chem, 2001.
- [56] Report on the global AIDS epidemic. UNAIDS; 2008.
- [57] Study Series Asia-Pacific's Opportunity: Investing To Avert An HIV/AIDS Crisis; ADB/UNAIDS July 2004.
- [58] Caputo A., Gavioli R., Ensoli B. *Recent Advances in the Development of HIV-1 Tat-Based Vaccines*. Current HIV Research 2004; 2:347-376.
- [59] Hallman K. *Gendered socioeconomic conditions and HIV risk behaviours among young people in South Africa*. African Journal of AIDS Research 2005; 4:37-50.
- [60] Donnelly J. *Saving the babies: a victory for Africa*. Boston Globe, 27 August 2007.
- [61] Sanders F. *Aids, un castigo di Dio?* Concilium 2007; 3:67-81.
- [62] Reddie G.A. *Hiv/Aids e comunità nere in Gran Bretagna*. Concilium 2007; 3:31-44.
- [63] Huigen, M.C., et al., *Multiple effects of HIV-1 trans-activator protein on the pathogenesis of HIV-1 infection*. Eur J Clin Invest, 2004.
- [64] Kwon, H.S., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein inhibits the SIRT1 deacetylase and induces T cell hyperactivation*. Cell Host Microbe, 2008.
- [65] Faller, E., et al., *IL-7 and HIV Tat protein act synergistically to down-regulate CD127 expression on CD8 T cells*. Int Immunol, 2009.
- [66] Miller L.M., et al. *Basal NF-kB controls IL-7 responsiveness of quiescent naïve T cells*. PNAS, vol.11,2014.
- [67] Sforza F., et al. *The HIV-1 Tat protein affects the programming and functionality of human CD8+ T cells by modulating the expression of T-box transcription factors*. AIDS, 2014.

- [68] Nicoli, F., et al., *The HIV-1 Tat protein induces the activation of CD8+ T cells and affects in vivo the magnitude and kinetics of antiviral responses*. Plos One, 2013.
- [69]UNAIDS, UNAIDS World AIDS Day Report | 2012. 2012.
- [70] Palella, F.J., Jr., et al., *Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators*. N Engl J Med, 1998. 338(13): p. 853-60.
- [71] Kitahata, M.M., et al., *Effect of early versus deferred antiretroviral therapy for HIV on survival*. N Engl J Med, 2009. 360(18): p. 1815-26.
- [72] *Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies*. Lancet, 2008. 372(9635): p. 293-9.
- [73] Volberding, P.A. and S.G. Deeks, *Antiretroviral therapy and management of HIV infection*. Lancet, 2010. 376(9734): p. 49-62.
- [74] Deeks, S.G. and A.N. Phillips, *HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity*. BMJ, 2009. 338: p. a3172.
- [75] Lange, C.G., et al., *CD4+ T-lymphocyte nadir and the effect of highly active antiretroviral therapy on phenotypic and functional immune restoration in HIV-1 infection*. Clin Immunol, 2002. 102(2): p. 154-61.
- [76] Hogg, R.S., et al., *Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy*. JAMA, 2001. 286(20): p. 2568-77.
- [77] Schweneker, M., et al., *HIV-induced changes in T cell signaling pathways*. J Immunol, 2008. 180(10): p. 6490-500.
- [78] Harari, A., et al., *Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy*. Blood, 2004. 103(3): p. 966-72.
- [79] McMahon, D., et al., *Short-course raltegravir intensification does not reduce persistent low-level viremia in patients with HIV-1 suppression during receipt of combination antiretroviral therapy*. Clin Infect Dis, 2010. 50(6): p. 912-9.
- [80] Siliciano, J.M. and R.F. Siliciano, *Targeting HIV reservoirs with valproic acid*. Hopkins HIV Rep, 2005. 17(5): p. 8-9.
- [81] Donnell, D., et al., *Heterosexual HIV-1 transmission after initiation of antiretroviral therapy: a prospective cohort analysis*. Lancet, 2010. 375(9731): p. 2092-8.
- [82] Abdool Karim, Q., et al., *Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women*. Science, 2010. 329(5996): p. 1168-74.
- [83] Celum, C.L., *HIV preexposure prophylaxis: new data and potential use*. Top Antivir Med, 2011. 19(5): p. 181-5.

- [84] Hallman, K., *Gendered socioeconomic conditions and HIV risk behaviours among young people in South Africa*. African Journal of AIDS Research 2005. 4(1): p. 37–50.
- [85] Deeks, S.G. and B.D. Walker, *Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy*. Immunity, 2007. 27(3): p. 406-16.
- [86] Pereyra, F., et al., *Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy*. J Infect Dis, 2008. 197(4): p. 563-71.
- [87] Betts, M.R., et al., *HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells*. Blood, 2006. 107(12): p. 4781-9.
- [88] Borrow, P., et al., *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 1994. 68(9): p. 6103-10.
- [89] Geldmacher, C., et al., *CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients*. J Virol, 2007. 81(5): p. 2440-8.
- [90] Appay, V., et al., *HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function*. J Exp Med, 2000. 192(1): p. 63-75.
- [91] Saez-Cirion, A., et al., *HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(16): p. 6776-81.
- [92] Boutwell, C.L., C.F. Rowley, and M. Essex, *Reduced viral replication capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtype C caused by cytotoxic-T-lymphocyte escape mutations in HLA-B57 epitopes of capsid protein*. J Virol, 2009. 83(6): p. 2460-8.
- [93] Goulder, P.J. and D.I. Watkins, *HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design*. Nat
- [94] Leslie, A.J., et al., *HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission*. Nat Med, 2004. 10(3): p. 282-9.
- [95] Kiepiela, P., et al., *CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load*. Nat Med, 2007. 13(1): p. 46-53.
- [96] Richman, D.D., et al., *Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(7): p. 4144-9.
- [97] Pereyra, F., et al., *Persistent low-level viremia in HIV-1 elite controllers and relationship to immunologic parameters*. J Infect Dis, 2009. 200(6): p. 984-90.
- [98] Walker, L.M., et al., *Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies*. Nature, 2011. 477(7365): p. 466-70.

- [99] Lambotte, O., et al., *Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers*. AIDS, 2009. 23(8): p. 897-906.
- [100] Ahmad, R., et al., *Evidence for a correlation between antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating anti-HIV-1 antibodies and prognostic predictors of HIV infection*. J Clin Immunol, 2001. 21(3): p. 227-33.
- [101] Flynn, N.M., et al., *Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection*. J Infect Dis, 2005. 191(5): p. 654-65.
- [102] Uberla, K., *HIV vaccine development in the aftermath of the STEP study: re-focus on occult HIV infection?* PLoS Pathog, 2008. 4(8): p. e1000114.
- [103] Li, F., et al., *Mapping HIV-1 vaccine induced T-cell responses: bias towards less-conserved regions and potential impact on vaccine efficacy in the Step study*. PLoS One, 2011. 6(6): p. e20479.
- [104] Rerks-Ngarm, S., et al., *Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand*. N Engl J Med, 2009. 361(23): p. 2209-20.
- [105] Haynes, B.F., et al., *Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial*. N Engl J Med, 2012. 366(14): p. 1275-86.
- [106] Autran, B., et al., *Greater viral rebound and reduced time to resume antiretroviral therapy after therapeutic immunization with the ALVAC-HIV vaccine (vCP1452)*. AIDS, 2008. 22(11): p. 1313-22.
- [107] Goebel, F.D., et al., *Recombinant gp160 as a therapeutic vaccine for HIV-infection: results of a large randomized, controlled trial*. European Multinational IMMUNO AIDS Vaccine Study Group. AIDS, 1999. 13(12): p. 1461-8.
- [108] Ensoli, B., et al., *Candidate HIV-1 Tat vaccine development: from basic science to clinical trials*. AIDS, 2006. 20(18): p. 2245-61.
- [109] Rodman, T.C., et al., *Human immunodeficiency virus (HIV) Tat-reactive antibodies present in normal HIV-negative sera and depleted in HIV-positive sera. Identification of the epitope*. J Exp Med, 1992. 175(5): p. 1247-53.
- [110] Richardson, M.W., et al., *Antibodies to Tat and Vpr in the GRIV cohort: differential association with maintenance of long-term non-progression status in HIV-1 infection*. Biomed Pharmacother, 2003. 57(1): p. 4-14.
- [111] Senkaali, D., et al., *Tat-specific binding IgG and disease progression in HIV type 1-infected Ugandans*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2008. 24(4): p. 587-94.
- [112] Rezza, G., et al., *The presence of anti-Tat antibodies is predictive of long-term nonprogression to AIDS or severe immunodeficiency: findings in a cohort of HIV-1 seroconverters*. J Infect Dis, 2005. 191(8): p. 1321-4.

- [113] Re, M.C., et al., *Antibodies against full-length Tat protein and some low-molecular-weight Tat-peptides correlate with low or undetectable viral load in HIV-1 seropositive patients*. J Clin Virol, 2001. 21(1): p. 81-9.
- [114] Zagury, J.F., et al., *Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as an HIV-1 vaccine*. J Hum Virol, 1998. 1(4): p. 282-92.
- [115] Caputo, A., R. Gavioli, and B. Ensoli, *Recent advances in the development of HIV-1 Tat-based vaccines*. Curr HIV Res, 2004. 2(4): p. 357-76.
- [116] Cao, J., et al., *Evolution of CD8+ T cell immunity and viral escape following acute HIV-1 infection*. J Immunol, 2003. 171(7): p. 3837-46.
- [117] van Baalen, C.A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS*. J Gen Virol, 1997. 78 (Pt 8): p. 1913-8.
- [118] Butto, S., et al., *Sequence conservation and antibody cross-recognition of clade B human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Tat protein in HIV-1-infected Italians, Ugandans, and South Africans*. J Infect Dis, 2003. 188(8): p. 1171-80.
- [119] Moreau, E., et al., *Important B-cell epitopes for neutralization of human immunodeficiency virus type 1 Tat in serum samples of humans and different animal species immunized with Tat protein or peptides*. J Gen Virol, 2004. 85(Pt 10): p. 2893-901.
- [120] Caputo, A., et al., *HIV-1 Tat-based vaccines: an overview and perspectives in the field of HIV/AIDS vaccine development*. Int Rev Immunol, 2009. 28(5): p. 285-334.
- [121] Cafaro, A., et al., *Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine*. Nat Med, 1999. 5(6): p. 643-50.
- [122] Cafaro, A., et al., *Vaccination with DNA containing tat coding sequences and unmethylated CpG motifs protects cynomolgus monkeys upon infection with simian/human immunodeficiency virus (SHIV89.6P)*. Vaccine, 2001. 19(20-22): p. 2862-77.
- [123] Maggiorella, M.T., et al., *Long-term protection against SHIV89.6P replication in HIV-1 Tat vaccinated cynomolgus monkeys*. Vaccine, 2004. 22(25-26): p. 3258-69.
- [124] Watkins, J.D., et al., *Reservoir cells no longer detectable after a heterologous SHIV challenge with the synthetic HIV-1 Tat Oyi vaccine*. Retrovirology, 2006. 3: p. 8.
- [125] Ensoli, B., et al., *The therapeutic phase I trial of the recombinant native HIV-1 Tat protein*. AIDS, 2008. 22(16): p. 2207-9.
- [126] Ensoli, B., et al., *The preventive phase I trial with the HIV-1 Tat-based vaccine*. Vaccine, 2009. 28(2): p. 371-8.
- [127] Ensoli, B., et al., *Therapeutic immunization with HIV-1 Tat reduces immune activation and loss of regulatory T-cells and improves immune function in subjects on HAART*. PLoS One, 2010. 5(11): p. e13540.

- [128] Gregoire, C.J. and E.P. Loret, *Conformational heterogeneity in two regions of TAT results in structural variations of this protein as a function of HIV-1 isolates*. J Biol Chem, 1996. 271(37): p. 22641-6.
- [129] Bellino, S., et al., *Parallel conduction of the phase I preventive and therapeutic trials based on the Tat vaccine candidate*. Rev Recent Clin Trials, 2009.
- [130] de Masson, A., et al., *Blimp-1 overexpression is associated with low HIV-1 reservoir and transcription levels in central memory CD4+ T cells from elite controllers*. AIDS, 2014.
- [131] Lehner T, Anton PA. *Mucosal immunity and vaccination against HIV*. AIDS. 2002;16 Suppl 4:S125-32.
- [132] Ensoli B, et al. *The preventive phase I trial with the HIV-1 Tat-based vaccine*. Vaccine. 2009;28:371-8.
- [133] Butto S, et al. *Sequence conservation and antibody cross-recognition of clade B human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Tat protein in HIV-1-infected Italians, Ugandans, and South Africans*. J Infect Dis. 2003;188:1171-80.
- [134] Watkins JD, et al. *Reservoir cells no longer detectable after a heterologous SHIV challenge with the synthetic HIV-1 Tat Oyi vaccine*. Retrovirology. 2006;3:8.
- [135] Caputo A, et al. *HIV-1 Tat-based vaccines: an overview and perspectives in the field of HIV/AIDS vaccine development*. Int Rev Immunol. 2009;28:285-334.
- [136] Caputo A, et al. *Characterization of immune responses elicited in mice by intranasal co-immunization with HIV-1 Tat, gp140 DeltaV2Env and/or SIV Gag proteins and the nontoxicogenic heat-labile Escherichia coli enterotoxin*. Vaccine. 2008;26:1214-27.
- [137] Caputo A, et al. *Novel biocompatible anionic polymeric microspheres for the delivery of the HIV-1 Tat protein for vaccine application*. Vaccine. 2004;22:2910-24.
- [138] Rodman TC, Pruslin FH, To SE, Winston R. *Human immunodeficiency virus (HIV) Tat-reactive antibodies present in normal HIV-negative sera and depleted in HIV-positive sera. Identification of the epitope*. J Exp Med. 1992;175:1247-53.
- [139] Rezza G, et al. *The presence of anti-Tat antibodies is predictive of long-term nonprogression to AIDS or severe immunodeficiency: findings in a cohort of HIV-1 seroconverters*. J Infect Dis. 2005;191:1321-4.
- [140] Re MC, et al. *Antibodies against full-length Tat protein and some low-molecular-weight Tat-peptides correlate with low or undetectable viral load in HIV-1 seropositive patients*. J Clin Virol. 2001;21:81-9.
- [141] Richardson MW, et al. *Antibodies to Tat and Vpr in the GRIV cohort: differential association with maintenance of long-term non-progression status in HIV-1 infection*. Biomed Pharmacother. 2003;57:4-14.

- [142] Zagury JF, et al. *Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as an HIV-1 vaccine.* J Hum Virol. 1998;1:282-92.
- [143] Bellino S, et al. *The presence of anti-Tat antibodies in HIV-infected individuals is associated with containment of CD4+ T-cell decay and viral load, and with delay of disease progression: results of a 3-year cohort study.* Retrovirology. 2014;11:49.
- [144] Lin SW, Cun AS, Harris-McCoy K, Ertl HC. *Intramuscular rather than oral administration of replication-defective adenoviral vaccine vector induces specific CD8+ T cell responses in the gut.* Vaccine. 2007;25:2187-93.
- [145] Kawahara M, Matsuo K, Honda M. *Intradermal and oral immunization with recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing the simian immunodeficiency virus Gag protein induces long-lasting, antigen-specific immune responses in guinea pigs.* Clin Immunol. 2006;119:67-78.
- [146] de Aizpurua HJ, Russell-Jones GJ. *Oral vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding.* J Exp Med. 1988;167:440-51.
- [147] Chang HC, Samaniego F, Nair BC, Buonaguro L, Ensoli B. *HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region.* AIDS. 1997;11:1421-31.
- [148] Ensoli B, et al. *Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma.* Nature. 1994;371:674-80.
- [149] Fanales-Belasio E, et al. *HIV-1 Tat addresses dendritic cells to induce a predominant Th1-type adaptive immune response that appears prevalent in the asymptomatic stage of infection.* J Immunol. 2009;182:2888-97.
- [150] Barackman JD, Ott G, Pine S, O'Hagan DT. *Oral administration of influenza vaccine in combination with the adjuvants LT-K63 and LT-R72 induces potent immune responses comparable to or stronger than traditional intramuscular immunization.* Clin Diagn Lab Immunol. 2001;8:652-7.
- [151] Zhou M, et al. *Recombinant rabies viruses expressing GM-CSF or flagellin are effective vaccines for both intramuscular and oral immunizations.* PLoS One. 2013;8:e63384.
- [152] Wu L. *Biology of HIV mucosal transmission.* Curr Opin HIV AIDS. 2008;3:534-40.
- [153] Castelli, F.A., et al., *Immunoprevalence of the CD4+ T-cell response to HIV Tat and Vpr proteins is provided by clustered and disperse epitopes, respectively.* Eur J Immunol, 2008. 38(10): p. 2821-31.
- [154] Addo, M.M., et al., *The HIV-1 regulatory proteins Tat and Rev are frequently targeted by cytotoxic T lymphocytes derived from HIV-1-infected individuals.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(4): p. 1781-6.

- [155] Ensoli, B., et al., *Candidate HIV-1 Tat vaccine development: from basic science to clinical trials*. AIDS, 2006. 20(18): p. 2245-61.
- [156] Beisel C, et al., *Reduced expression of Blimp-1 in memory B cells in patients with HIV-1 infection suggests distinct roles of this molecule for B and T cell regulation*. AIDS. 2014 Oct 23;28(16):2489-91
- [157] Larsson M, et al., *A Molecular signatures of T-cell inhibition in HIV-1 infection*. Retrovirology 10: 31, 2-013
- [158] Thaventhiran JE, Fearon DT *Control of HIV infection: escape from the shadow of Blimp-1*. Eur J Immunol 43: 323-326, 2013.
- [159] Lu P, et al., *Blimp-1 represses CD8 T cell expression of PD-1 using a feed-forward transcriptional circuit during acute viral infection*. J Exp Med 211: 515-527, 2014.
- [160] Seddiki N, Kaufmann DE. *Editorial overview: cell dysfunction and exhaustion in HIV infection*. Curr Opin HIV AIDS. 2014 Sep;9(5):437-8
- [161] Ensoli F. et al., *HIV-1 Tat immunization restores immune homeostasis and attacks the HAART-resistant blood HIV DNA: results of a randomized phase II exploratory clinical trial*. Retrovirology in press

7. PUBBLICAZIONI

Finessi V., Nicoli F., Gallerani E., Sforza F., Sicurella M., Cafaro A., Caputo A., Ensoli B. and Gavioli R. Effects of different routes of administration on the immunogenicity of the Tat protein and a Tat-derived peptide. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 2015;11(4).

Sforza F., Nicoli F., Gallerani E., **Finessi V.**, Reali E., Cafaro A., Caputo A., Ensoli B, Gavioli R. HIV-1 Tat affects the programming and functionality of human CD8⁺ T cells by modulating the expression of T-box transcription factors. *AIDS*. 2014 Jul 31;28(12):1729-38. doi: 10.1097/QAD.0000000000000315.

Sicurella M., Nicoli F., Gallerani E., Volpi I., Berto E., **Finessi V.**, Destro F., Manservigi R., Cafaro A., Ensoli B., Caputo A, Gavioli R. and Marconi P.C. An Attenuated Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) Encoding the HIV-1 Tat Protein Protects Mice from a Deadly Mucosal HSV1 Challenge *PLoS One*. 2014; 9(7): e100844.

Nicoli F., **Finessi V.**, Sicurella M., Rizzotto L., Gallerani E., Destro F., Cafaro A., Marconi P., Caputo A., Ensoli B., Gavioli R. The HIV-1 Tat protein induces the activation of CD8⁺ T cells and affects in vivo the magnitude and kinetics of antiviral responses. *PLoS One*. 2013; 8(11): e77746.

Effects of different routes of administration on the immunogenicity of the Tat protein and a Tat-derived peptide

Running title: Tat protein administered by different routes

Valentina Finessi*¹, Francesco Nicoli*¹, Eleonora Gallerani¹, Fabio Sforza¹, Mariaconcetta Sicurella¹, Aurelio Cafaro², Antonella Caputo³, Barbara Ensoli² and Riccardo Gavioli¹

¹ Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Ferrara, Italy

² National AIDS Center, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

³ Department of Molecular Medicine, University of Padova, Padova, Italy

*Valentina Finessi and Francesco Nicoli equally contributed to the writing of this article

Correspondence should be sent to Riccardo Gavioli, Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Via Borsari 46, 44121 Ferrara, Italy. Telephone: +390532974407. Fax: +390532974408. E-mail: r.gavioli@unife.it

HIV-1 Tat affects the programming and functionality of human CD8⁺ T cells by modulating the expression of T-box transcription factors

Fabio Sforza^{a,*}, Francesco Nicoli^{a,*}, Eleonora Gallerani^a,
Valentina Finessi^a, Eva Reali^b, Aurelio Cafaro^c, Antonella Caputo^d,
Barbara Ensoli^c and Riccardo Gavioli^a

Objective: HIV infection is characterized by several immune dysfunctions of both CD8⁺ and CD4⁺ T cells as hyperactivation, impairment of functionality and expansion of memory T cells. CD8⁺ T-cell dysfunctions have been associated with increased expression of T-bet, Eomesdermin and pro-inflammatory cytokines, and with down-regulation of CD127. The HIV-1 trans-activator of transcription (Tat) protein, which is released by infected cells and detected in tissues of HIV-positive individuals, is known to contribute to the dysregulation of CD4⁺ T cells; however, its effects on CD8⁺ T cells have not been investigated. Thus, in this study, we sought to address whether Tat may affect CD8⁺ T-cell functionality and programming.

Methods: CD8⁺ T cells were activated by T-cell receptor engagement in the presence or absence of Tat. Cytokine production, killing capacity, surface phenotype and expression of transcription factors important for T-cell programming were evaluated.

Results: Tat favors the secretion of interleukin-2, interferon- γ and granzyme B in CD8⁺ T cells. Behind this functional modulation we observed that Tat increases the expression of T-bet, Eomesdermin, Blimp-1, Bcl-6 and Bcl-2 in activated but not in unstimulated CD8⁺ T lymphocytes. This effect is associated with the down-regulation of CD127 and the up-regulation of CD27.

Conclusion: Tat deeply alters the programming and functionality of CD8⁺ T lymphocytes.

© 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2014, **28**:1729–1738

Keywords: CD8⁺, Eomes, HIV, immune activation, T-cell programming, Tat, T-bet

Introduction

HIV is one of the major plagues in the world for the number of people infected and deaths per year [1]. The most devastating damages caused by HIV infection are observed at the level of cellular immunity, and include the depletion of CD4⁺ T cells and important dysfunctions of both CD8⁺ and CD4⁺ T cells as impairment of

functionality [2,3], exhaustion [4], increased T-cell proliferation [5], susceptibility to apoptosis [6,7] and expansion of memory T cells [8–10]. This status of chronic immune activation and immune senescence involves the whole T-cell compartment, including uninfected and non-HIV-specific T cells [11], is also present during antiretroviral therapy (ART) and contributes to the appearance of AIDS-defining and nondefining diseases [12]. Different

^aDepartment of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Ferrara, ^bLaboratory of Translational Immunology, I.R.C.C.S. Istituto Ortopedico Galeazzi, Milan, ^cNational AIDS Center, Istituto Superiore di Sanità, Rome, and ^dDepartment of Molecular Medicine, University of Padova, Padova, Italy.

Correspondence to Professor Riccardo Gavioli, PhD, Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, via Fossato di Mortara 74, 44121 Ferrara, Italy.

E-mail: r.gavioli@unife.it

*Dr Fabio Sforza and Dr Francesco Nicoli contributed equally to the writing of this article.

Received: 29 January 2014; revised: 20 April 2014; accepted: 22 April 2014.

DOI:10.1097/QAD.0000000000000315

ISSN 0269-9370 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

1729



An Attenuated Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) Encoding the HIV-1 Tat Protein Protects Mice from a Deadly Mucosal HSV1 Challenge

Mariaconcetta Sicurella^{1,3}, Francesco Nicoli², Eleonora Gallerani², Ilaria Volpi¹, Elena Berto¹, Valentina Finessi², Federica Destro^{2,3}, Roberto Manservigi¹, Aurelio Cafaro⁴, Barbara Ensoli⁴, Antonella Caputo³, Riccardo Gavioli^{1,2*}, Peggy C. Marconi^{1*}

1 Department of Life Sciences and Biotechnology, Section of Applied Microbiology and Pathology, University of Ferrara, Ferrara, Italy, **2** Department of Life Sciences and Biotechnology, Section of Biochemistry and Molecular Biology, University of Ferrara, Ferrara, Italy, **3** Department of Molecular Medicine, University of Padova, Padova, Italy, **4** National AIDS Center, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Abstract

Herpes simplex virus types 1 and 2 (HSV1 and HSV2) are common infectious agents in both industrialized and developing countries. They cause recurrent asymptomatic and/or symptomatic infections, and life-threatening diseases and death in newborns and immunocompromised patients. Current treatment for HSV relies on antiviral medications, which can halt the symptomatic diseases but cannot prevent the shedding that occurs in asymptomatic patients or, consequently, the spread of the viruses. Therefore, prevention rather than treatment of HSV infections has long been an area of intense research, but thus far effective anti-HSV vaccines still remain elusive. One of the key hurdles to overcome in anti-HSV vaccine development is the identification and effective use of strategies that promote the emergence of Th1-type immune responses against a wide range of epitopes involved in the control of viral replication. Since the HIV1 Tat protein has several immunomodulatory activities and increases CTL recognition of dominant and subdominant epitopes of heterologous antigens, we generated and assayed a recombinant attenuated replication-competent HSV1 vector containing the *tat* gene (HSV1-Tat). In this proof-of-concept study we show that immunization with this vector conferred protection in 100% of mice challenged intravaginally with a lethal dose of wild-type HSV1. We demonstrate that the presence of Tat within the recombinant virus increased and broadened Th1-like and CTL responses against HSV-derived T-cell epitopes and elicited in most immunized mice detectable IgG responses. In sharp contrast, a similarly attenuated HSV1 recombinant vector without Tat (HSV1-LacZ), induced low and different T cell responses, no measurable antibody responses and did not protect mice against the wild-type HSV1 challenge. These findings strongly suggest that recombinant HSV1 vectors expressing Tat merit further investigation for their potential to prevent and/or contain HSV1 infection and dissemination.

Citation: Sicurella M, Nicoli F, Gallerani E, Volpi I, Berto E, et al. (2014) An Attenuated Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV1) Encoding the HIV-1 Tat Protein Protects Mice from a Deadly Mucosal HSV1 Challenge. PLoS ONE 9(7): e100844. doi:10.1371/journal.pone.0100844

Editor: Lbahir BenMohamed, UC Irvine Medical Center, United States of America

Received: December 18, 2013; **Accepted:** May 30, 2014; **Published:** July 17, 2014

Copyright: © 2014 Sicurella et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the University of Ferrara and the University of Padova. AIDS Vaccine Integrated Project (AVIP, VI FP), Italian National Institute of Health (AIDS Program ISS-2009), the Italian Ministry for the University and Scientific Research (PRIN-2009) and FAR (2010 and 2011) from the University of Ferrara. Mariaconcetta Sicurella was recipient of a PhD fellowship from CARIPARO Foundation (Padova) and Federica Destro of a post-doctorate fellowship from the University of Padova. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: mcy@unife.it (PM); gvr@unife.it (RG)

† Shared senior authorship

Introduction

Worldwide prevalence of the herpes simplex virus (HSV) infection remains high, making it a major public health concern. Indeed, HSV type 1 (HSV1) and type 2 (HSV2) are pathogens well-adapted to their human hosts, infecting them through lytic infection of cutaneous and mucosal epithelial cells, and can lie dormant in the sensory ganglia, reactivating periodically [1]. Recurrent productive infections, which can be either symptomatic or asymptomatic (and therefore unwittingly spread), give rise to several clinical illnesses, including cold sores, keratitis, blepharitis, meningitis, encephalitis and genital infections, which may have severe sequelae in neonatal and immune-compromised patients [2–7].

Due to unwitting transmission, latent infection, periodic reactivation and asymptomatic virus shedding, HSV is easily spread and is unlikely to be eradicated by preventative strategies. Indeed, currently available drugs are only efficacious against replicating HSV, but have no effect on the latent virus or its reactivation [8]. Hence the identification of new vaccination approaches capable of preventing the spread of the virus and/or blocking its reactivation is likely to have great global impact on public health. Unfortunately, however, the numerous attempts to develop anti-HSV vaccines have thus far proved unsuccessful [9–20]. Chiron and GlaxoSmithKline vaccine candidates based on recombinant HSV envelope glycoproteins have failed to show efficacy [21,22]. This has prompted researchers to increase their

The HIV-1 Tat Protein Induces the Activation of CD8⁺ T Cells and Affects *In Vivo* the Magnitude and Kinetics of Antiviral Responses

Francesco Nicoli¹, Valentina Finessi¹, Mariacconcetta Sicurella^{1,2}, Lara Rizzotto³, Eleonora Gallerani¹, Federica Destro^{1,2}, Aurelio Cafaro⁴, Peggy Marconi¹, Antonella Caputo², Barbara Ensoli⁴, Riccardo Gavioli*

1 Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Ferrara, Italy, **2** Department of Molecular Medicine, University of Padova, Padova, Italy, **3** Department of Biomedical Sciences, Azienda Ospedaliero Universitaria Sant'Anna, Ferrara, Italy, **4** National AIDS Center, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Abstract

T cells are functionally compromised during HIV infection despite their increased activation and proliferation. Although T cell hyperactivation is one of the best predictive markers for disease progression, its causes are poorly understood. Anti-tat natural immunity as well as anti-tat antibodies induced by Tat immunization protect from progression to AIDS and reverse signs of immune activation in HIV-infected patients suggesting a role of Tat in T cell dysfunctionality. The Tat protein of HIV-1 is known to induce, *in vitro*, the activation of CD4⁺ T lymphocytes, but its role on CD8⁺ T cells and how these effects modulate, *in vivo*, the immune response to pathogens are not known. To characterize the role of Tat in T cell hyperactivation and dysfunction, we examined the effect of Tat on CD8⁺ T cell responses and antiviral immunity in different *ex vivo* and *in vivo* models of antigenic stimulation, including HSV infection. We demonstrate for the first time that the presence of Tat during priming of CD8⁺ T cells favors the activation of antigen-specific CTLs. Effector CD8⁺ T cells generated in the presence of Tat undergo an enhanced and prolonged expansion that turns to a partial dysfunctionality at the peak of the response, and worsens HSV acute infection. Moreover, Tat favors the development of effector memory CD8⁺ T cells and a transient loss of B cells, two hallmarks of the chronic immune activation observed in HIV-infected patients. Our data provide evidence that Tat affects CD8⁺ T cell responses to co-pathogens and suggest that Tat may contribute to the CD8⁺ T cell hyperactivation observed in HIV-infected individuals.

Citation: Nicoli F, Finessi V, Sicurella M, Rizzotto L, Gallerani E, et al. (2013) The HIV-1 Tat Protein Induces the Activation of CD8⁺ T Cells and Affects *In Vivo* the Magnitude and Kinetics of Antiviral Responses. PLoS ONE 8(11): e77746. doi:10.1371/journal.pone.0077746

Editor: Ashok Chauhan, University of South Carolina School of Medicine, United States of America

Received: May 16, 2013; **Accepted:** September 6, 2013; **Published:** November 4, 2013

Copyright: © 2013 Nicoli et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the University of Ferrara and the University of Padova and the Italian National AIDS Program, and by the Gilead Fellowship Program. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: r.gavioli@unife.it

Introduction

Since its isolation in 1983, the human immunodeficiency virus (HIV) is still one of the major plagues worldwide with about 34 million of infected individuals and 1.7 million of deaths per year [1]. After almost 30 years of research, our understanding of HIV pathogenesis has progressed immensely, and we now know that progression toward disease depends on multiple parameters, including immunological, virological, intrinsic, genetic, as well as environmental factors. Studies on viral fitness and vaccine-development indicate that several components of the virus, including the so-called "regulatory proteins", may contribute to the impairment of immune cells observed in HIV-infected individuals. During the

course of HIV infection CD4⁺ and CD8⁺ T cells are functionally compromised despite their increased activation and proliferation [2-4]. Hyperactivation of T cells is one of the best predictive markers for progression toward AIDS and, although the causes are not fully understood, the forces that lead to immune dysfunction may differ for CD4⁺ and CD8⁺ T cells [2].

Tat is a regulatory protein produced very early after the HIV infection, necessary for viral gene expression, cell-to-cell virus transmission and disease progression [5-8] and can be released extracellularly [9-12] by a leaderless secretory pathway, even during antiretroviral therapy [13]. Upon release, Tat binds heparan sulphate proteoglycans of the extracellular matrix and is detected in the tissues of infected individuals [9,14] where it can exert its effects in non-infected HIV-specific

8. RINGRAZIAMENTI

Gli anni di questo dottorato sono stati ricchi di esperienze e di cambiamenti, sono tante le persone da ringraziare, ma per primi sicuramente chi mi ha accompagnato nel percorso in laboratorio:

Riccardo Gavioli, che mi ha permesso di fare questa esperienza, convincendomi a portarla fino alla fine nonostante gli imprevisti incontrati lungo la strada, sono felice di averlo fatto. Il lab è stato una seconda famiglia per cinque anni, ed è merito soprattutto tuo se in un ambiente lavorativo si riesce a creare un'atmosfera così "di casa", mi ritengo molto fortunata per averne fatto parte, e sono assolutamente sicura che mi mancherà moltissimo.. svegliarsi la mattina con la voglia di andare a lavoro, è un'esperienza che tutti dovrebbero provare..

Eleonora Gallerani, pilastro fondamentale del laboratorio, insegnante severa ma soprattutto brava, e punto di riferimento per chiunque abbia avuto la fortuna di essere introdotto al mondo scientifico da lei. Per me, oggi, amica e confidente sempre sincera e pronta ad ascoltare, grazie, per tutto quello che mi hai insegnato, e non parlo solo di lavoro..

Francesco, sei l'esempio di chi insegue i propri sogni con determinazione e ne fa una carriera, spero davvero tu possa arrivare dove meriti, e auguro tutto il meglio a te e alla tua famiglia

Fabio, da subito sei stato quello con cui ho riso di più, e anche battibeccato di più.. grazie, per i momenti belli dentro e fuori dal lab

Federica e Maria, ormai lontane da un po' più di tempo, ma sempre importanti e presenti per gli insegnamenti e il sostegno che mi avete dato..

Grazie anche a tutti i ragazzi/e che sono passati dal lab, e con cui ho condiviso elisa, elispot o facs..

Laura, Francesca, i Mattei, e tutti i più vecchi, Davide, Andrea, Noemi, Anna, Fanuel, Tiziano...mi sarò sicuramente dimenticata qualcuno..scusatemi..

Una in particolare merita un ringraziamento speciale... Tea, senza di te questa tesi non so se sarebbe arrivata alla fine, quindi grazie, e grazie anche a Matteo Rosa, ottimo insegnante di PCR!

Babis, arrivato da poco e già "più anziano" del lab, mi raccomando...!!

Grazie alle mie colleghe in farmacia Elisa, Giulia, Ilaria e Paola, per i cambi turno, i ritardi e l'aiuto che mi avete dato per permettermi di essere presente in laboratorio..

Un grazie particolare a Ilaria che ha vissuto più da vicino il nervosismo dell'ultimo periodo, capendo perfettamente il mio stato d'animo... e a Giulia, diventata sicuramente prima un'amica che una collega, grazie per esserci..

Grazie alle amiche di sempre che c'erano per la laurea e alcune anche per il diploma, e alle più nuove, che sono arrivate dopo.. abbiamo perso qualcuno per strada, ma siamo sempre noi, e nei momenti importanti sempre presenti...perciò grazie Aghy, Novi, Sara, Giada, Chiara!

Grazie Giulia, perché ancora una volta ci sei da sempre, e sei presente anche più di una sorella, non so davvero come farei senza di te!

Grazie ai miei genitori, ancora una volta, per il sostegno, l'incoraggiamento e l'appoggio incondizionato che mi date sempre, per aiutarmi nei momenti difficili, e per permettermi di fare le mie scelte a modo mio..se sono quella che sono, e sono arrivata qui oggi è anche e soprattutto grazie a voi

Grazie a mio fratello, sappiamo entrambi che ci vogliamo bene, anche e soprattutto quando litighiamo!

Grazie nonna, perché credi in me e non manchi mai di dimostrarlo..

Avrò sicuramente scordato qualcuno, ma in generale, voglio dire grazie a tutte le persone che mi hanno accompagnato in questo percorso, chi solo per un pezzo e chi solo nel finale... tutti avete comunque contribuito alla crescita e ai cambiamenti che ho fatto in questi anni, sia a livello professionale che personale..

Grazie di cuore