

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

CURRICULUM BIOTECNOLOGIE MEDICHE

CICLO XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 06/A3

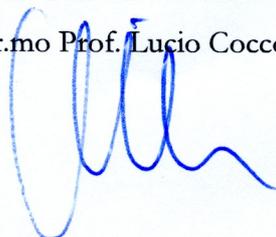
Settore Scientifico Disciplinare: MED/07

**STUDIO DELLA PATOGENESI DI HIV-1 NEL COMPARTIMENTO OSSEO:
EFFETTI DELLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE CONVENZIONALE
E NUOVI APPROCCI ALL'ERADICAZIONE**

Presentata da: Alberto Clò

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo Prof. Lucio Cocco



Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Carla Re



INDICE

1. INTRODUZIONE	4
1.1. Genoma virale	4
<i>Sequenze fiancheggianti Long Terminal Repeats (LTRs)</i>	5
1.2. Proteoma virale e farmaci ad azione antiretrovirale	6
1.2.1. Proteasi virale e farmaci inibitori (classe PI)	9
<i>Struttura della proteasi</i>	9
<i>Farmaci inibitori della proteasi: meccanismo d'azione</i>	9
<i>Farmaci inibitori della proteasi: loro impiego nella pratica clinica</i>	10
1.2.2. Integrasi virale e farmaci inibitori (classe InI)	11
<i>Il processo di integrazione</i>	11
<i>Struttura dell'integrasi di HIV-1</i>	13
<i>L'integrazione avviene tramite la formazione di grandi complessi macromolecolari</i>	14
<i>Processo di integrazione</i>	16
<i>Farmaci inibitori dell'integrasi (classe InI)</i>	17
1.2.3. Glicoproteine Gp120, Gp41 e farmaci inibitori dell'ingresso del virus (classe EI)	17
<i>Struttura delle glicoproteine Gp120 e Gp41</i>	17
<i>Farmaci inibitori della fusione ed entrata del virus (classe EI)</i>	19
1.2.4. Transcrittasi inversa virale e farmaci inibitori della retrotrascrizione (classe NRTI e NNRTI)	20
<i>Struttura della transcrittasi inversa</i>	20
<i>Farmaci inibitori della transcrittasi inversa (classe NRTI)</i>	22
<i>Farmaci inibitori della transcrittasi inversa (classe NNRTI)</i>	22
1.3. HIV e compartimento osso	24
1.3.1. Monitoraggio del rapporto rimodellamento/riassorbimento	24
1.3.2. Lesioni ossee correlate a infezione da HIV e HAART	25
1.4. Sintesi di endonucleasi chimeriche per terapia genica	27
1.4.1. Classificazione delle endonucleasi	27
1.4.2. FokI	28
<i>Struttura di FokI</i>	28
<i>FokI e le Zinc-finger nucleasi</i>	30
1.5. Reservoirs di infezione	31
<i>Forme episomiali di HIV-1: 1-LTR e 2-LTR</i>	33
2. OBIETTIVO	35
3. MATERIALI E METODI	38
3.1. Studio di popolazione su coorte di pazienti naïve per la terapia	38
<i>Popolazione e criteri di inclusione</i>	38
<i>Quantificazione dei markers con test ELISA</i>	38
<i>Analisi statistica</i>	39

3.2. Studio degli effetti della terapia antiretrovirale convenzionale su i livelli apoptotici e profilo di espressione di markers del metabolismo osseo nell linea osteoblastica HOBIT	39
<i>Colture cellulari e trattamento coi farmaci</i>	39
<i>Dosaggio di OPG e RANKL nel surnatante di coltura</i>	40
<i>Analisi dell'apoptosi nelle cellule HOBIT</i>	41
<i>Quantificazione in Real Time RT-PCR di diversi markers di attività e differenziamento osteoblastico</i>	41
3.3. Studio di cloni chimerici Integrasi /FokI nel corso di infezione di HIV-1 e sul genoma provirale integrato in cellule linfoblastoidi umane	42
<i>Costruzione dei cloni chimerici</i>	42
<i>Colture cellulari e trattamento coi farmaci</i>	45
<i>Stocks virali, infezione e dosaggio della proteina virale p24</i>	45
<i>Generazione di cloni cellulari transfettati stabilmente</i>	46
<i>Analisi quantitativa del DNA provirale tramite Real Time PCR (qPCR)</i>	46
<i>Analisi quantitativa del RNA provirale tramite Real Time RT-PCR (qRT-PCR)</i>	47
<i>Analisi statistica</i>	47
4. RISULTATI	48
4.1. La terapia HAART altera il turnover osseo in pazienti naïve già a 6 mesi dall'inizio della terapia	48
4.1.1. Caratteristiche dei pazienti all'arruolamento	48
4.1.2. Andamento dei markers di turnover osseo	49
4.2. Effetti della terapia antiretrovirale convenzionale sulla linea osteoblastica HOBIT	51
4.2.1. Quantificazione dell'apoptosi a 24 e 48 ore post trattamento con PI	51
4.2.2. Quantificazione dell'apoptosi a 1, 3 e 7 giorni post-trattamento con farmaci in singolo ed in combinazione	53
4.2.3. Dosaggio di OPG, RANKL e rapporto OPG/RANKL a 24 e 48 ore post trattamento con PI	55
4.2.4. Quantificazione dell'mRNA di diversi markers ossei a 1, 3 e 7 giorni post-trattamento con combinazioni di farmaci	58
4.3. Costruzione di proteine chimeriche integrasi/FokI in grado di revertire l'integrazione virale	60
4.3.1. Clonazione e mutagenesi delle proteine chimeriche integrasi/FokI in vettori di espressione	60
4.3.2. Transfezione stabile ed espressione dei cloni chimerici in cellule T linfoblastoidi Jurkat	62
4.3.3. Specifici cloni transfettati in cellule Jurkat contrastano l'infezione da HIV-1	63
4.3.4. Transfezione stabile ed espressione dei cloni chimerici in cellule T linfoblastoidi 8E5LAV, contenenti una singola copia integrata di HIV-1	65
4.3.5. pChim2M, pChim5M e pChim11.3 transfettati stabilmente in cellule 8E5LAV riducono sensibilmente i livelli di DNA provirale, RNA virale e proteina p24	66
5. DISCUSSIONE	68
6. CONCLUSIONI	78
7. BIBLIOGRAFIA	81

1. INTRODUZIONE

1.1. Genoma virale

Il genoma del virus dell'immunodeficienza umana è racchiuso all'interno del virione ed è composto da due filamenti di RNA positivo monocatenario della lunghezza di 9,7kb. Il virus HIV-1 possiede nove geni distinti: tre codificano per le poliproteine Gag, Pol ed Env che sono fattori strutturali ed enzimatici fondamentali, comuni a tutti i retrovirus; altri due geni codificano per proteine a funzione regolatoria, Tat e Rev, mentre le restanti quattro sequenze codificano per proteine accessorie, quali Nef, Vif, Vpr e Vpu (Frankel and Young, 1998).

Integrato nel cromosoma della cellula ospite, il genoma virale contiene ORFs (*open reading frames*) per 16 proteine che sono sintetizzate partendo da 10 trascritti diversi. Le linee nere del grafico indicano trascritti pre e post *splicing*, su cui sono riportate le sequenze codificanti, con il relativo codone d'inizio. Di questi trascritti, quelli codificanti per Gag-Pol, Vif, Vpr e Vpu-Env necessitano della presenza della proteina Rev, regolatrice dell'espressione dei geni virali, per essere esportati dal nucleo cellulare al citoplasma. Il target ad RNA di Rev, il *Rev response element* (RRE), è contenuto nel gene codificante le proteine dell'envelope (Env).

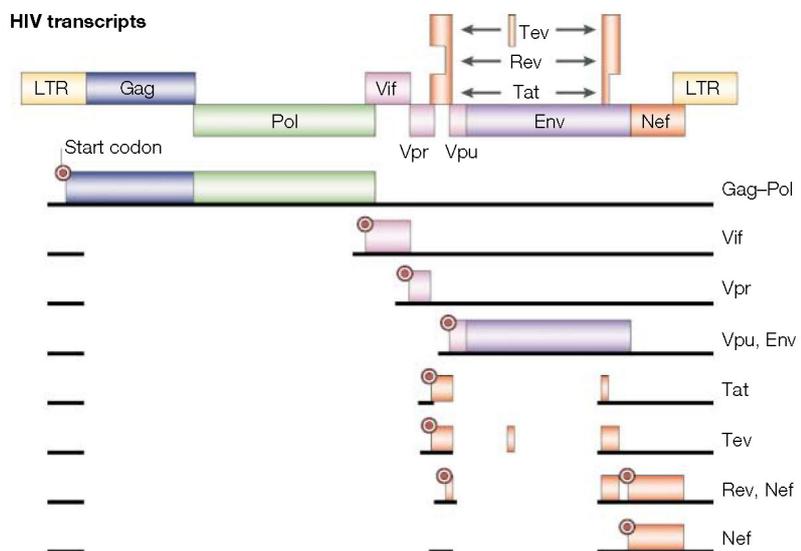


Figura I: Schema della organizzazione del genoma di HIV-1 e suoi principali trascritti. (Peterlin and Trono, 2003)

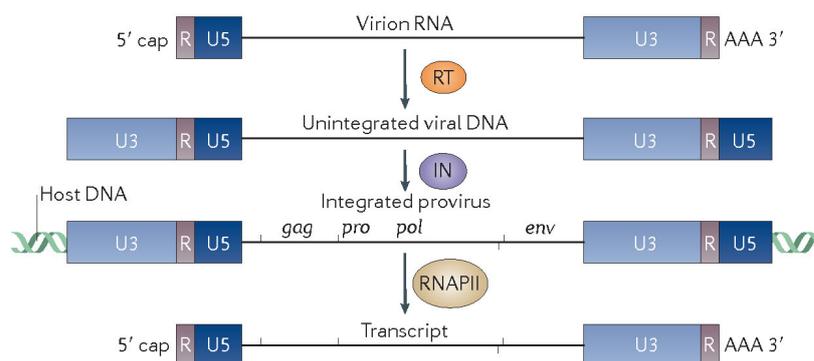


Figura II: Diverse forme del genoma virale di HIV-1. I retrovirus in genere, durante il loro ciclo vitale extracellulare, possiedono il proprio corredo genetico sotto forma di RNA a singolo filamento. Successivamente all'infezione virale, il genoma viene retrotrascritto in cDNA a doppio filamento dall'enzima virale trascrittasi inversa (RT), con la sintesi delle sequenze fiancheggianti LTR complete. Il cDNA provirale subisce ora il processo di integrazione nel genoma della cellula ospite per mezzo dell'enzima virale integrasi (IN) e di diversi altri fattori virali e cellulari. Il cDNA provirale, ora integrato, può essere trascritto dalla RNA polimerasi di tipo II della cellula ospite (Stoye, 2012).

Sequenze fiancheggianti Long Terminal Repeats (LTRs)

Ciascun filamento possiede una regione per l'appaiamento posizionata al 5' che consente la costituzione di una forma duplex e favorisce il loro inserimento nel capsido al momento dell'assemblaggio. Questa regione è denominata ψ (psi) ed è formata spazialmente da quattro α -eliche che vanno ad interagire con la proteina nucleocapsidica (NC) e i suoi due motivi a dita di zinco (De Guzman *et al.*, 1998; Morellet *et al.*, 1992).

Sempre all'estremità 5' si trovano un *capping* di residui di guanosina fosforilata e metilata e il *primer binding site* per la cattura del tRNA che fungerà da primer per la retrotrascrizione. L'estremità 3' è invece libera e poliadenilata.

Ciascun filamento termina con due sequenze ripetute dirette (segmenti R), seguite internamente da due regioni distinte a seconda dell'estremità, U5 all'estremità 5' e U3 all'estremità 3'. Il completamento della retrotrascrizione del genoma di HIV richiede due eventi di appaiamento fra i segmenti R: la peculiare modalità di processazione fa sì che il filamento di DNA formatosi presenti ai propri estremi due sequenze identiche composte dai segmenti U5, R e U3 e denominate Long Terminal Repeats (LTRs). Benché non codificanti, queste sequenze sono fondamentali nel garantire la trascrizione, quindi la replicazione, perché contengono sequenze *enhancer* atte a

legare molti fattori di trascrizione e il segnale di poliadenilazione.

Funzionalmente le LTRs possono essere suddivise in quattro regioni distinte: l'elemento transattivante TAR all'interno del segmento R, il promotore principale, un sito *enhancer* e una regione di modulazione presso la regione U3 (Pereira *et al.*, 2000). Il promotore contiene il sito iniziatore Inr, la sequenza TATA-box e tre siti di legame per SP1, mentre il successivo *enhancer* è in grado di legare i fattori NF- κ B (Nuclear Factor κ B), NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*), AP-1 e alcuni membri della famiglia Ets (Peterlin and Trono, 2003) (**Figura III**). L'attivazione di questi due elementi garantisce un elevato tasso di trascrizione del genoma virale, sia in cellule T attivate, sia in macrofagi, ma non è sufficiente ad assicurare la produzione di trascritti completi. A questa mancanza il virus ovvia con la produzione del fattore Tat che, legandosi alla sequenza TAR dei messaggeri nascenti, aumenta la processività dell'RNA polimerasi permettendo l'allungamento e la terminazione dei trascritti in modo appropriato.

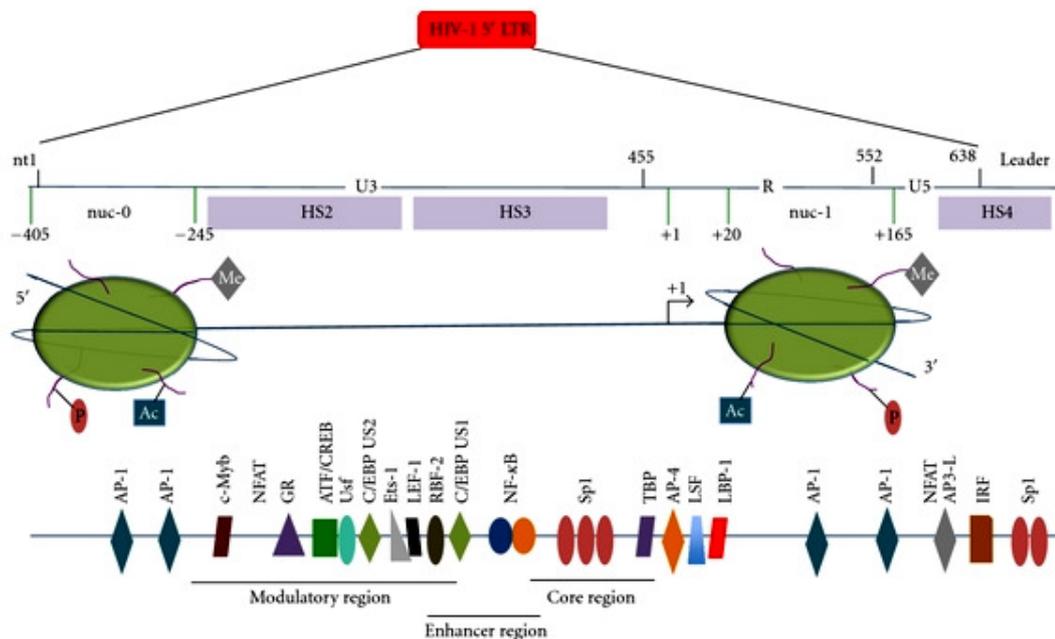


Figura III: Architettura molecolare delle sequenze LTR di HIV-1. Il promotore virale (LTR) può essere diviso in tre regioni: U3, R e U5. A seguito dell'integrazione, la sequenza dell'LTR mostra sezioni ipersensibili alla DNasi I (HS2, HS3 e HS4), che risultano dalla precisa collocazione di due nucleosomi: nuc-0 e nuc-1. Le regioni che rimangono esposte, tra i due nucleosomi, sono estremamente ricche in siti di legame per fattori di trascrizione, tra cui diverse proteine regolatorie del processo di trascrizione di HIV-1. Questi fattori rispondono a stimoli intra- ed extracellulari, con conseguente up- o downregolazione di specifici fattori di trascrizione (Li *et al.*, 2012).

1.2. Proteoma virale e farmaci ad azione antiretrovirale

Il proteoma di HIV-1 è costituito anzitutto da due poliproteine precorritrici: Gag (*Group-specific antigen*) e Gag-Pol (*Group-specific antigen* e polimerasi). Queste vengono processate e tagliate dalla proteasi virale in 9 subunità: proteasi (PR), trascrittasi inversa (RT), integrasi (IN), proteina di matrice (MA), proteina del capside (CA), p2, nucleocapside (NC), p1 e p6 (**Figura IV**).

Il precursore Env, a differenza di Gag e Gag-Pol, viene processato e tagliato da proteasi cellulari (come la furina) in due porzioni: la porzione di superficie (SU) gp120 e la porzione transmembrana (TM) gp41 (**Figura IV**).

Tat è il principale regolatore trascrizionale della sequenza LTR (*long terminal repeat*). Il proprio target sull'RNA virale, l'elemento TAR (*transactivation response element*), è presente all'estremità 5' di ogni trascritto virale.

Rev è la principale proteina che regola il processo di export-nucleare e regola il passaggio dalla trascrizione dei geni virali precoci (*early*) alla trascrizione dei geni virali tardivi (*late*).

Le proteine Vif (*viral-infectivity factor*), Vpr (*viral protein r*), Vpu (*viral protein u*) e Nef (*negative effector*) sono note come proteine accessorie in quanto, in taluni sistemi di coltura cellulare, si sono rivelate non strettamente necessarie per la crescita virale. Ciononostante hanno diversi ruoli, fondamentali nella replicazione virale e la progressione verso la sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) *in vivo* (Peterlin and Trono, 2003).

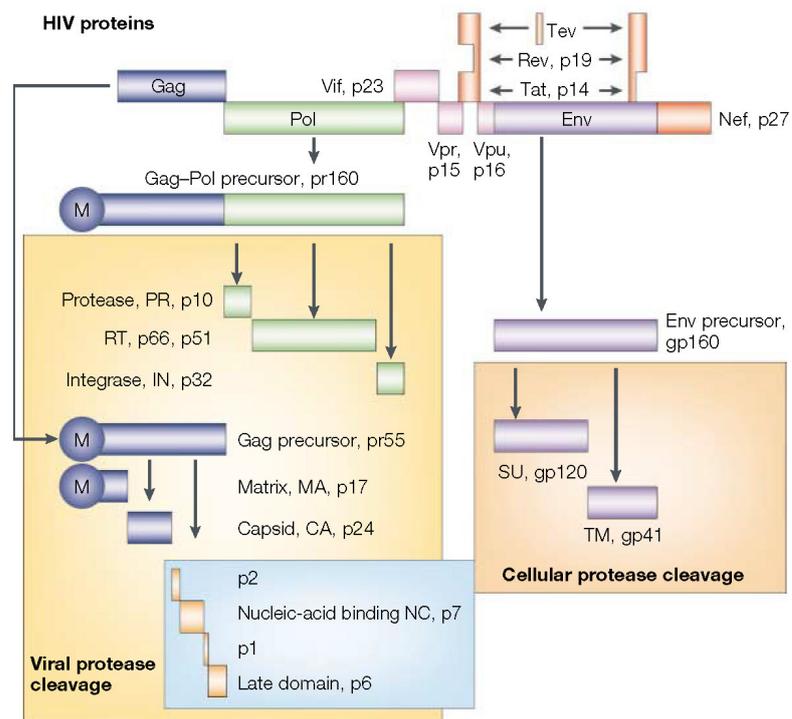


Figura IV: Schema dell'organizzazione del proteoma di HIV-1, dei suoi precursori proteici e dei diversi processi di maturazione che coinvolgono proteine virali e cellulari (Peterlin and Trono, 2003).

Di seguito verranno discussi alcuni tra i principali componenti proteici virali, che ad oggi sono oggetto di studio per la terapia antiretrovirale ad alta attività, la HAART (*highly active antiretroviral therapy*), e le diverse classi di farmaci ad azione antiretrovirale, ad oggi in uso nella pratica clinica o in trials clinici avanzati.

1.2.1. Proteasi virale e farmaci inibitori (classe PI)

Struttura della proteasi

La proteasi di HIV-1 è un piccolo enzima, composto da due catene proteiche identiche di 99 aminoacidi ciascuna. Le due catene che compongono la proteasi assumono una conformazione tale da formare un tunnel, visibile in **Figura V-A**, coperto da due “ali” flessibili. Quando le due ali si aprono, possono abbracciare la catena proteica bersaglio avvolgendola e bloccandola nel tunnel.

Il sito attivo si trova nel centro del tunnel dove, per mezzo di una molecola d’acqua, coordinata da due aminoacidi aspartato, avviene il taglio proteolitico della catena proteica bersaglio (**Figura V-D**) (Goodsell, 2000).

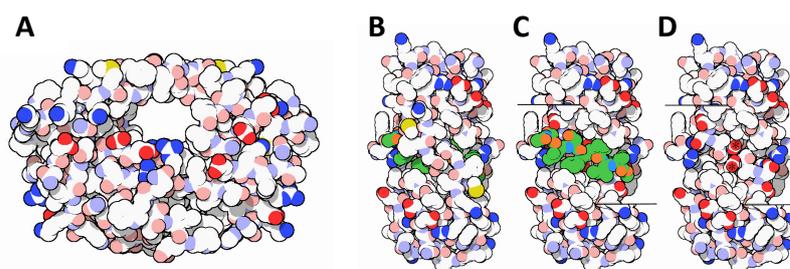


Figura V: Proteasi di HIV-1. A) Visione dall’alto del tunnel, le due ali si trovano nella parte alta della figura; B) Visione laterale del tunnel bloccato dalle due ali; C) Rimuovendo le due ali, è possibile visualizzare il tunnel, occupato da un inibitore della proteasi; D) Rimuovendo le due ali e l’inibitore della proteasi cocristallizzato, è possibile visualizzare il sito attivo, evidenziato con due asterischi.

Farmaci inibitori della proteasi: meccanismo d’azione

I farmaci inibitori della proteasi di HIV-1 hanno una struttura composta da gruppi funzionali ricchi di carbonio, che interagiscono con l’interno del tunnel della proteasi e con il sito attivo. Tra i diversi farmaci inibitori della proteasi, nei quattro che sono stati cocristallizzati con la proteina (**Figura VI**) è possibile apprezzare quanto la struttura 3D dei composti sia simile. È possibile notare i due atomi di carbonio centrali (**Figura VI**, in rosso) presenti in tutte e quattro le strutture, che interagiscono con la molecola d’acqua, normalmente presente sotto le due ali della proteina, coordinata dai due aspartati del sito attivo.

I farmaci simulano una catena proteica, riuscendo a legare la proteasi proprio come farebbe una catena proteica. Tuttavia sono molto più resistenti e stabili di una catena proteica, pertanto la proteasi non riesce a tagliarli, consentendo agli inibitori di rimanere nel tunnel occupandolo e bloccando, di fatto, l'enzima (Goodsell, 2000).

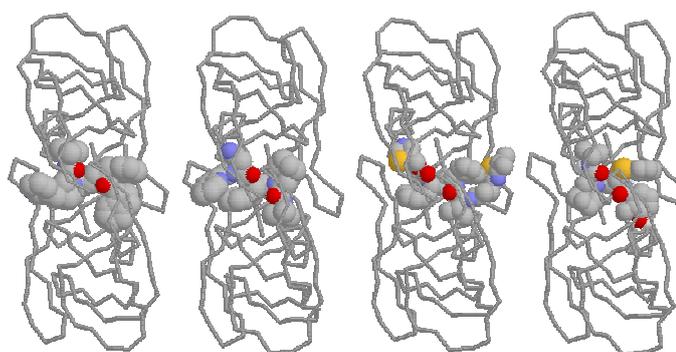


Figura VI: Proteasi di HIV-1 cocristallizzata con quattro diversi farmaci inibitori della proteasi. Da sinistra a destra, i farmaci sono Indinavir (PDB 1HSG), Saquinavir (PDB 1HXB), Ritonavir (PDB 1HXW) e Nelfinavir (PDB 1OHR).

Farmaci inibitori della proteasi: loro impiego nella pratica clinica

I farmaci di prima generazione appartenenti a questa categoria (indinavir, saquinavir, nelfinavir) avevano diverse problematiche, dalla comparsa di diversi consistenti effetti collaterali, alla difficile somministrazione con molte pillole e restrizioni sulla dieta. L'introduzione del ritonavir come booster ha migliorato notevolmente l'efficacia terapeutica di questi farmaci, anche se tuttavia, la difficoltà del paziente a sopportare una terapia così fisicamente pesante, portava spesso a fallimenti terapeutici per abbandono. Questo è il principale motivo per cui i farmaci NNRTI sono così più diffusi nella pratica clinica del trattamento iniziale dell'infezione da HIV-1.

ATV/r (atazanavir boosterato ritonavir), DRV/r (darunavir boosterato ritonavir) e LPV/r (lopinavir boosterato ritonavir) hanno mostrato tuttavia un'ottima attività antivirale, con minor frequenza di effetti collaterali e conseguente miglior *compliance* del paziente e continuità nel trattamento. Questo, unito alla scarsa attività di selezione di mutanti resistenti dei PI/r e alla alta emivita di questi farmaci, rappresenta un enorme vantaggio per il paziente, anche in caso di "dimenticanza" nell'attenersi al regime terapeutico prescritto dal parte del paziente in terapia (Tejerina and Bernaldo de Quirós, 2011).

Studi clinici mettono spesso in relazione la terapia con PI/r con fenomeni di lipodistrofia e alterazione generalizzata del profilo lipidico, anche se ATV/r e DRV/r hanno dimostrato di essere più conservativi dello status lipidico del paziente in terapia.

I principali svantaggi di questa classe di farmaci sono l'elevato numero di compresse che deve assumere il paziente, oltre al costo di questo regime terapeutico, superiore a quello con NNRTI e alla necessità del booster di ritonavir.

Infine sono emersi dubbi sull'efficacia di questi farmaci nel penetrare nel sistema nervoso centrale, specialmente se associati al backbone terapeutico di TDF/FTC (Canestri *et al.*, 2010).

1.2.2. Integrasi virale e farmaci inibitori (classe InI)

Il virus dell'immunodeficienza umana necessita, per la propria replicazione, l'inserzione del genoma virale nel DNA genomico della cellula infettata, attraverso un processo catalizzato dall'enzima virale integrasi (IN).

Il processo di integrazione

Come altri retrovirus, HIV è un virus con genoma a singolo filamento di RNA. Nel corso dell'infezione, l'RNA virale è rilasciato nella cellula infettata in seguito alla fusione dell'envelope virale con la membrana cellulare (**Figura VII**). L'RNA virale viene ora utilizzato come *template* e trascritto in una copia a doppio filamento di DNA dell'RNA virale (cDNA provirale), con le estremità composte dalle sequenze LTR mature, codificate dalla trascrittasi inversa (Sierra *et al.*, 2005).

Il passaggio da RNA virale a cDNA provirale è uno step necessario per il processo virale del virus, per la codifica delle proteine virali e per la produzione di nuove copie di RNA virale. La trascrizione del cDNA virale necessita inoltre dell'integrazione nel genoma della cellula ospite. Questa inserzione cromosomica prende in nome di integrazione ed è catalizzata dall'enzima integrasi, codificato dal virus stesso. Il cDNA virale integrato nel genoma della cellula ospite prende il nome di provirus (**Figura VII**). A seconda del sito di integrazione del cDNA, il provirus

può risultare espresso in modo costitutivo, se integrato in prossimità di un promotore cellulare attivo, o rimanere silente fino al momento di una risposta ad uno stimolo proliferativo.

Infine, la trascrizione e traduzione dei geni virali, unitamente alla sintesi del genoma virale, produce i componenti molecolari necessari al packaging del virione e alla sua maturazione, necessari al rilascio delle nuove particelle virali infettanti.

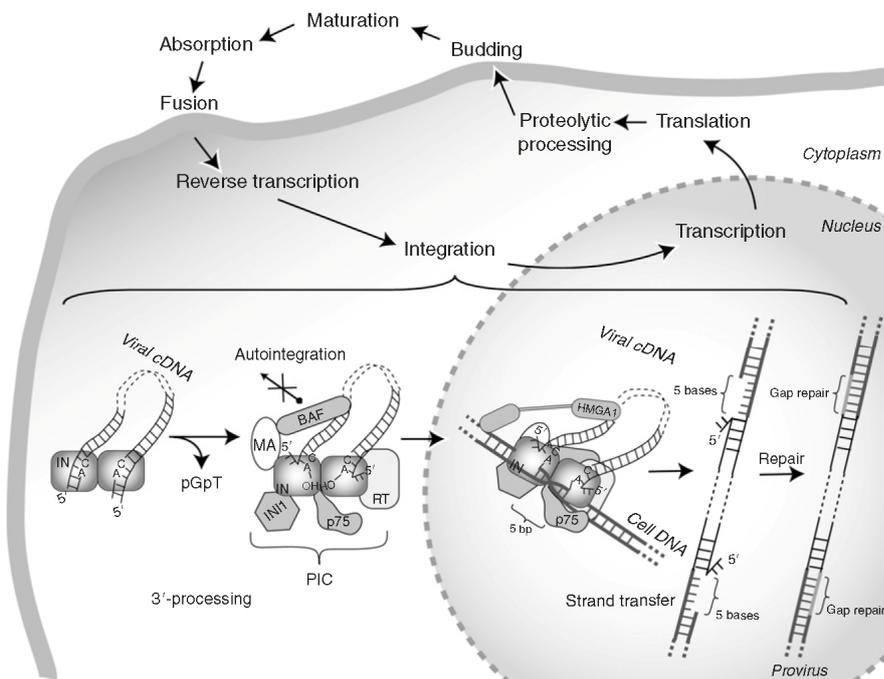


Figura VII: Rappresentazione schematica del processo di integrazione nel ciclo vitale di HIV. IN, integrasi; PIC, complesso di preintegrazione; BAF, barrier-to-autointegration factor; MA, proteina di matrice di HIV; INI1, IN interactor 1; LEDGF/p75, lens epithelium-derived growth factor/transcriptor coactivator p75; RT, trascrittasi inversa di HIV; HMG A1, high mobility group chromosomal protein A1. (Semenova *et al.*, 2008)

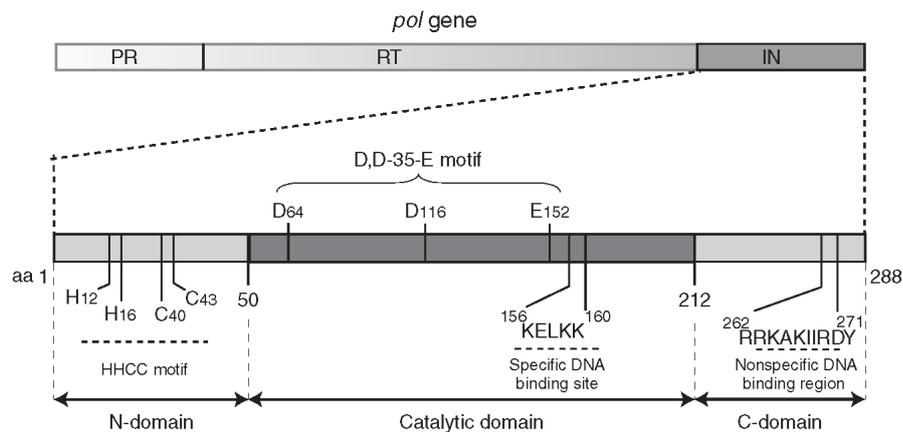


Figura VIII Semenova2: Domini funzionali dell'integrasi di HIV-1.

Struttura dell'integrasi di HIV-1

Il gene virale *pol* codifica per tre enzimi virali (proteasi, trascrittasi inversa e integrasi) che vengono tradotti come poliproteina (**Figura VIII**). L'enzima integrasi viene generato dal taglio proteolitico operato dalla proteasi di HIV durante la maturazione del virione e produce una proteina di circa 32kDa.

La proteina integrasi è composta da tre domini: dominio N-terminale (NTD), dominio centrale (core) catalitico (CCD) e dominio C-terminale (CTD) (**Figura VIII**). Il dominio NTD promuove la multimerizzazione dell'integrasi, coordinando uno ione zinco (motivo HHCC) ed è coinvolto nell'integrazione delle estremità del cDNA virale nel genoma della cellula ospite. Nel CTD risiede l'attività di legame col DNA sequenza-indipendente, indipendente, inoltre, da ioni metallici. Ciascuna molecola di integrasi contiene un sito catalitico nel CCD, dove troviamo gli aminoacidi che compongono la sequenza tipica dei siti catalitici di endonucleasi, il motivo DDE (Asp64, Asp116, e Glu152). Questi residui acidi coordinano almeno un catione divalente (Mg^{2+} o Mn^{2+}) che funge da ponte con il substrato di DNA (Marchand *et al.*, 2006). La mutazione di uno di questi residui aminoacidici abolisce l'attività catalitica dell'integrasi (Semenova *et al.*, 2008).

L'integrazione avviene tramite la formazione di grandi complessi macromolecolari

L'integrazione cellulare richiede la presenza di diversi cofattori oltre all'integrasi (Van Maele *et al.*, 2006). Il complesso di preintegrazione (*pre-integration complex*, PIC) è una componente fondamentale del processo di integrazione. Il PIC è formato sia da proteine virali (proteina di matrice, nucleocapside, trascrittasi inversa), sia da fattori eucariotici della cellula ospite [lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75), integrase interactor 1 (INI1), barrier-to-autointegration factor (BAF), high mobility group chromosomal protein A1 (HMGA1)] (**Figura VII**).

Probabilmente il cDNA virale viene legato dall'integrasi (IN) in uno step immediatamente successivo alla retrotrascrizione del genoma virale. IN, inoltre, lega direttamente LEDGF/p75, INI1, RT e la proteina di matrice (Van Maele and Debyser, 2005).

Nonostante diversi studi descrivano quali siano e quanto siano importanti i cofattori per l'integrazione di HIV, la nostra comprensione del meccanismo che sottende l'integrazione di per se rimane incompleta. Ciò nonostante è ragionevole pensare che la funzione principale del PIC sia di separare le due principali reazioni catalizzate da IN, ovvero il 3' processing (3'-P) e lo *strand transfer* (ST), in diversi compartimenti cellulari *in vivo* e con una regolazione temporale ben precisa, mentre *in vitro* queste due reazioni avvengono consecutivamente, senza ritardo.

Inoltre, è verosimile che IN possa essere mantenuta in uno stato inattivo nel PIC fino alla migrazione del complesso nel nucleo, per prevenire fenomeni di autointegrazione. Nel complesso di preintegrazione, infatti, troviamo il cofattore cellulare BAF, che possiede la funzione di prevenire fenomeni di autointegrazione (Zheng *et al.*, 2000). Probabilmente altri fattori associati al PIC mantengono IN nello stato inattivo. Ad esempio, la stessa trascrittasi inversa virale può inibire l'attività catalitica di IN *in vitro* (Oz *et al.*, 2002).

Il cDNA virale è protetto dall'azione di nucleasi dopo avere isolato PIC con IN *wild type*, mentre se il PIC è formato da IN mutanti risulta sensibile alle nucleasi (Chen *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1997). Per questo motivo, si ritiene che IN non sia solamente coinvolta nell'azione del 3'-P, ma anche nella formazione e assemblaggio del PIC, probabilmente favorita da una corretta e completa azione di 3'-P.

Sembra inoltre possibile che i cambiamenti conformazionali del PIC che portano alla riattivazione di IN, avvengano durante il passaggio del PIC nel nucleo e/o durante il suo legame con la cromatina.

I fattori cellulari maggiormente coinvolti nel favorire e regolare il legame del cDNA virale al DNA cromosomico della cellula ospite: la proteina emerina e LEDGF/p75. La proteina emerina è stato dimostrato essere coinvolta nella formazione del PIC attraverso BAF, inoltre sembra essere cruciale nell'interazione tra cDNA virale e DNA cromosomico, così come BAF, sebbene BAF ed emerina non facilitino l'integrazione di HIV (Jacque and Stevenson, 2006).

Un altro ponte molecolare che lega la proteina IN alla cromatina è LEDGF/p75. Il legame di LEDGF/p75 ad IN veicola la proteina virale sulla cromatina, promuovendo lo ST (Cherepanov *et al.*, 2000; Maertens, 2003). Il fatto che HIV-1 non riesca ad infettare con successo cellule in cui LEDGF/p75 sia silenziato, suggerisce un ruolo critico per LEDGF/p75 nell'integrazione efficiente di HIV.

Impedire l'interazione di LEDGF/p75 con IN può essere considerata una possibile strategia terapeutica (Peat *et al.*, 2012; Rouzic *et al.*, 2013).

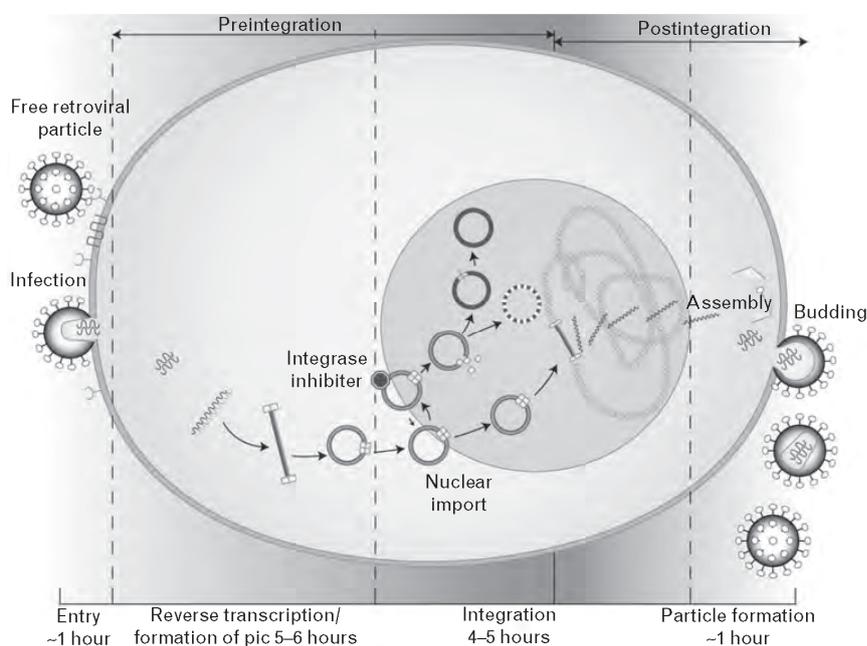
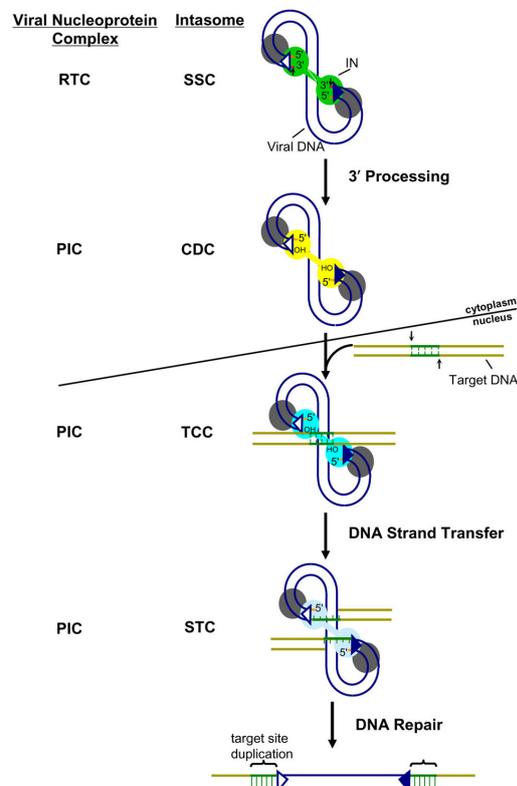


Figura IX: Linea temporale del processo di integrazione virale. L'inibitore dello *strand transfer* dell'integrasi lega il proprio bersaglio solamente dopo la retroscrittione del genoma virale in cDNA e, per espletare la propria funzione, necessita di rimanere legato al complesso di preintegrazione fino a quando gli enzimi cellulari competenti non metabolizzano il DNA provirale.

Processo di integrazione

La sottostruttura SSC del complesso virale RTC viene formata quando IN si lega alle estremità LTR (estremità U3 del LTR-5' ed estremità U5 del LTR-3') del cDNA virale appena formato. Il 3'-processing, che può avere luogo nel citoplasma (Miller *et al.*, 1997), converte il RTC nel PIC, producendo il CDC, con al capo 3' la coppia di nucleotidi CA che protrude e l'ossidrile -OH all'estremità. Il TCC si forma nel nucleo quando il PIC si localizza sul DNA cromosomico della cellula ospite. L'integrazione del LTR-3' produce lo STC, con l'estremità 5' del DNA virale non ancora saldata. La ricombinazione del DNA con meccanismo di riparo, mediato da enzimi cellulari del sistema DNA repair e successiva proteolisi dei componenti del PIC, dà come prodotto il provirus integrato, fiancheggiato dalla duplicazione della sequenza di DNA genomico tagliata dal PIC.

Figura X: Processo di integrazione. Complessi nucleoproteici retrovirali e reazione di taglio e fusione del DNA mediato da integrasi. Abbreviazioni: RTC, complesso della trascrittasi inversa (*reverse transcriptase complex*); IN, integrasi; PIC, complesso di preintegrazione (*pre-integration complex*); NTD, dominio N-terminale; CCD, dominio core catalitico; SSC, complesso sinaptico stabile (*stable synaptic complex*); CDC, complesso con donatore tagliato (*cleaved donor complex*); TCC, complesso di cattura del bersaglio (*target capture complex*); STC, complesso di trasferimento del filamento (*strand transfer complex*). (Krishnan and Engelman, 2012)



Farmaci inibitori dell'integrasi (classe InI)

Lo studio di fase 3 STARTMRK ha dimostrato come il raltegravir, farmaco inibitore dell'integrasi, non sia inferiore come efficacia rispetto all'efavirenz (classe NNRTI), entrambi in combinazione con TDF/FTC (Lennox, 2012). Il gruppo trattato con raltegravir ha mostrato una soppressione virale più rapida, minore alterazione dell'assetto lipidico e minori effetti collaterali dati dalla terapia (Lennox *et al.*, 2009, 2010).

All'interno del *trial* STARTMRK sono state studiate, inoltre, le differenze tra le sequenze di integrasi appartenenti a virus di sottotipo B e virus del sottotipo non-B. Comparando la risposta virologica dei ceppi virali B e non-B, il tasso di soppressione virologica nei pazienti affetti da virus non-B era 94,5%, contro l'88,7% dei pazienti con sottotipo B (Rockstroh *et al.*, 2011).

Un altro farmaco di nuova generazione inibitore dell'integrasi è l'elvitegravir. Questo farmaco esiste in coformulazione con cobicistat (ovvero un composto che inibisce il metabolismo dell'elvitegravir a livello epatico, con meccanismo d'azione simile al ritonavir) e TDF/FTC, prendendo il nome di "Quad". un piccolo studio di fase 2 ha messo a confronto il Quad con un regime terapeutico tradizionale, EFV/TDF/FTC. A 48 settimane dall'inizio dello studio, entrambi i gruppi hanno raggiunto una soppressione virale dell'83%, ma il gruppo con elvitegravir ha evidenziato ridotti effetti collaterali psichiatrici (17% vs 26%, $p=0,02$) (Cohen *et al.*, 2011).

Infine, in tempi recenti, è stato prodotto il dolutegravir, inibitore dell'integrasi che non necessita di booster. *In vitro* il dolutegravir è risultato sensibilmente più resistente allo sviluppo di farmacoresistenze, risultando attivo anche contro isolati clinici resistenti al raltegravir (Canducci *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2012).

1.2.3. Glicoproteine Gp120, Gp41 e farmaci inibitori dell'ingresso del virus (classe EI)

Struttura delle glicoproteine Gp120 e Gp41

GP120 è una proteina virale pesantemente glicosilata, che forma la porzione distale delle *spikes* virali che protrudono dall'envelope virale, codificate dal gene *env*

(Figura XI). Contiene domini conservati (C1-C5) e cinque domini variabili (V1-V5) (Starcich *et al.*, 1986). E regioni conservate formano il core della proteina, mentre le regioni variabili costituiscono i loops distali (Leonard *et al.*, 1990).

Nella sua struttura terziaria, Gp120 forma tre distinti domini strutturali: un dominio interno (*inner domain*), un dominio esterno (*outer domain*) e un foglietto-ponte (*bridging sheet*) (Kwong *et al.*, 1998). Il dominio interno risulta ben conservato tra i diversi ceppi di HIV e va incontro a cambiamenti conformazionali nel momento in cui la Gp120 lega il recettore e il corecettore, cambiamento conformazionale necessario e cruciale nel processo di entrata del virus (Finzi *et al.*, 2010). Il dominio esterno è più esposto rispetto al dominio interno, risulta fortemente glicosilato e contiene tre delle cinque regioni variabili (V3-V5), presentando alla risposta umorale innata una superficie estremamente variabile. Il dominio foglietto-ponte contiene importanti residui che contribuiscono al binding con il sito di legame del recettore CD4 e il sito di legame del corecettore (Huang *et al.*, 2007; Kwong *et al.*, 1998). Il dominio foglietto-ponte contiene inoltre le due regioni variabili V1 e V2, anch'esse pesantemente glicosilate, che hanno il ruolo di mascherare il sito di legame con il recettore CD4 fino al momento del contatto col recettore (Finzi *et al.*, 2010; Kwon *et al.*, 2012)

Gp41 comprende la regione prossimale transmembrana della struttura che protrude dall'envelope virale (*spike*) ed è costituito da tre diverse regioni: la coda C-terminale citoplasmatica, il dominio transmembrana, e un ampio dominio che sia affaccia all'esterno dell'envelope virale e interagisce in modo non-covalente con Gp120, contiene il peptide di fusione all'N-terminale e due regioni che contengono due motivi *heptad-repeat* (HR), coinvolti nella fusione tra membrana virale e cellulare (Figura XI).

Il dominio esterno di Gp41 rappresenta la porzione che partecipa nella fusione alla membrana e ha quattro principali strutture. La porzione più vicina alla membrana prende appunto il nome di *membrane-proximal external region* (MPER), seguita dalle due regioni HR con struttura ad α -elica (HR2/C-elica e HR1/N-elica) ed infine il peptide di fusione al N-terminale. La regione MPER è altamente conservata ed è cruciale per la fusione e infezione del virus (Muñoz-Barroso *et al.*, 1999).

In natura, la Gp41 forma un trimero, necessario per la fusione virale, in cui le regioni HR formano una struttura a sei eliche molto stabile, che prende il nome di

struttura a spirali avvolte, *coiled-coil*, che porta serve a collarare spazialmente vicine la membrana virale e cellulare a seguito dell'acoraggio del peptide di fusione.

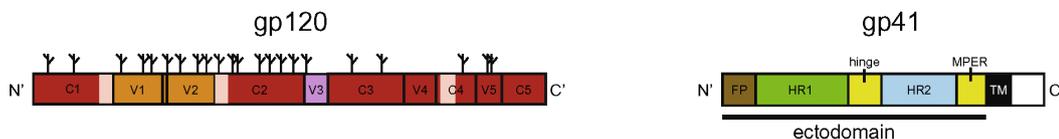


Figura XI: Rappresentazione schematica delle proteine dell'envelope Gp120 e Gp41. Gp120 contiene cinque domini conservati (C1-C5) e cinque domini variabili (V1-V5). Il simbolo Ψ indica la posizione di N-glicosilazioni conservate. Le regioni più chiare nelle regioni C1, C2 e C4 indicano elementi del minidominio a foglietto di ponte che stabilizza Gp120 durante il legame con il recettore CD4. Gp41 possiede un peptide di fusione (FP) nella regione N-terminale, regioni HR1 e HR2 che contengono due motivi *heptad-repeat* e un dominio di ancoraggio transmembrana (TM). Infine la regione cerniera (hinge) e la regione prossimale al dominio transmembrana (MPER). (Haqqani and Tilton, 2013)

Farmaci inibitori della fusione ed entrata del virus (classe EI)

Poiché il processo di entrata di HIV nella cellula ospite è molto complesso, coinvolge diverse interazioni sequenziali di Gp120 e Gp41 con le proteine della superficie della cellula ospite, i farmaci della classe inibitori dell'entrata sono un gruppo estremamente eterogeneo. I potenziali target dei farmaci di questa categoria sono infatti innumerevoli, con diversi target e diversi meccanismi d'azione coinvolti. Gli esempi riportati sono farmaci in uso nella pratica clinica o in fase di trials clinici.

Inibitori dell'interazione Gp120-CD4: nel 1998, la risoluzione cristallografica a raggi X della struttura di Gp120 associata al CD4 ha permesso di individuare il sito di legame CD4-Gp120 e di evidenziarne i dettagli molecolari. Ciò ha consentito di indirizzare l'attività di ricerca verso piccole molecole che fossero in grado di inibire o bloccare questa interazione (Kwong *et al.*, 1998; Wyatt *et al.*, 1998). Le molecole BMS-448043 e BMS-626529 sembrano essere in grado di stabilizzare una conformazione di Gp120 tale da impedire il legame con il recettore CD4 (Ho *et al.*, 2006).

Inibitori dell'interazione Gp120-corecettore: la capacità di HIV-1 di utilizzare diversi corecettori per l'entrata nella cellula ospite (principalmente CCR5 e CXCR4) rende necessario che i pazienti siano testati per determinare il tropismo del virus infettante (Bon *et al.*, 2013a). Il maraviroc è attivo contro isolati clinici che sfruttano il corecettore CCR5 (tropismo R5) già ad una scala nanomolare ed è uno dei due far-

maci ad azione inibitoria dell'entrata virale approvati per l'utilizzo clinico in USA e in Europa (Dorr *et al.*, 2005). In recenti test *in vitro*, maraviroc ha mostrato una ridotta tossicità su colture di adipociti (Díaz-Delfín *et al.*, 2013), migliorando inoltre il profilo lipidico in pazienti dislipidemicici (Bonjoch *et al.*, 2013). Sono in fase di sviluppo anche farmaci che bloccano l'interazione tra Gp120 e CXCR4, l'altro corecettore utilizzato da HIV, ma ancora non sono stati approvati per la pratica clinica (Skerlj *et al.*, 2011).

Inibitori della fusione alla membrana Gp41-mediata: nel 2003 è stato approvato il primo farmaco inibitore della fusione della particella virale con la membrana cellulare, l'enfuvirtide (T20), che assieme a maraviroc rappresentano gli unici farmaci della classe degli inibitori dell'entrata disponibili per la pratica clinica. Enfuvirtide è un peptide sintetico lineare composto da 36 aminoacidi, che mimano la regione HR2 di Gp41. Questo farmaco ha dimostrato la propria valenza nella lotta all'infezione in due diversi trials clinici (Kilby *et al.*, 2002; Lalezari *et al.*, 2003).

1.2.4. Transcrittasi inversa virale e farmaci inibitori della retroscrittazione (classe NRTI e NNRTI)

Struttura della transcrittasi inversa

L'enzima transcrittasi inversa (*reverse transcriptase*, RT) è costituita da due catene polipeptidiche p66 (66kDa, 560 aminoacidi) e p51 (51kDa, 440 aminoacidi). La grande poliproteina codificata da HIV-1, Gag-Pol, viene tagliata dalla proteasi virale per produrre la subunità p66. La subunità p66 è composta da due domini funzionali: il dominio N-terminale possiede attività polimerasica, mentre il dominio C-terminale è una RNasi H. In natura accade che due catene di p66 dimerizzano e che la proteasi di HIV-1 tagli la porzione codificante per la RNasi H di una delle due catene, producendo un eterodimero di RT p66/p51 stabile (Jacob-Molina *et al.*, 1993; Kohlstaedt *et al.*, 1992). La fusione di un virione di HIV-1 con la cellula target porta al rilascio nel citoplasma di due copie di RNA virale e all'incirca 50 copie di enzima RT.

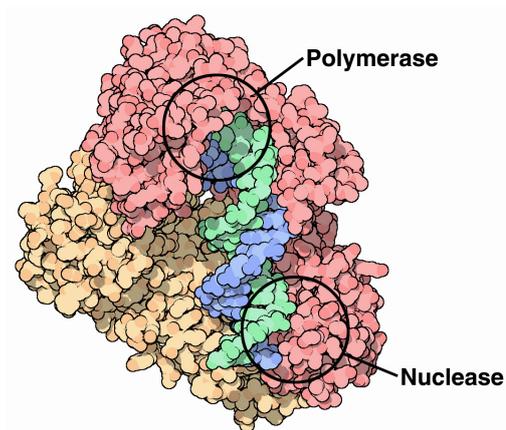


Figura XII: Eterodimero p66/p51 in presenza della catena di DNA nascente (Goodsell, 2002)

Il dominio polimerasico della RT (**Figura XIII**) assomiglia nella forma ad una “mano destra”, con dita (*fingers*), palmo (*palm*), pollice (*thumb*) e sottodomini di connessione che collegano il dominio con attività polimerasica con quello codificante per l'attività RNasi H. La subunità p51, similmente contiene dita, palmo, pollice e sottodomini di connessione, ma questi ultimi hanno una conformazione spaziale differente da quelli presenti nella subunità p66. Nella p51, i sottodomini di connessione sono assemblati in una struttura sufficientemente rigida da dare supporto strutturale alla p66. I sottodomini di p66 sono invece flessibili e possono andare incontro ai cambiamenti conformazionali necessari all'enzima RT per espletare la propria funzione.

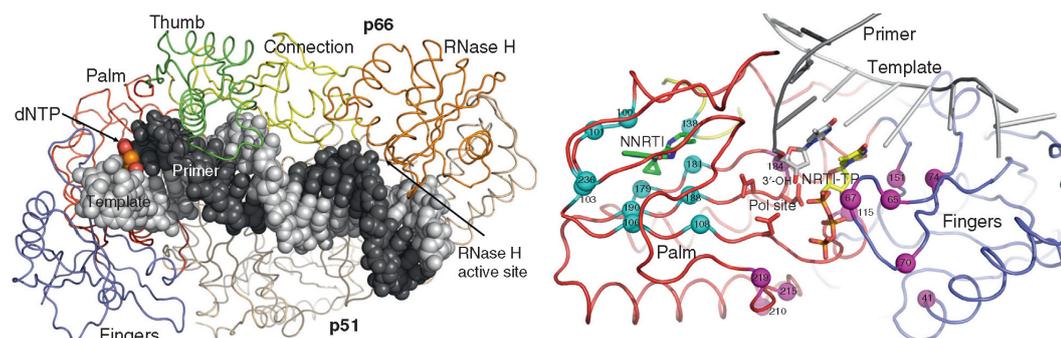


Figura XIII: Struttura della RT di HIV-1 e principali mutazioni che provocano farmacoresistenza. A) rappresentazione in modalità *ribbon* del complesso RT-DNA-dNTP. B) Principali siti di mutazione che inducono farmacoresistenza: in azzurro i residui che inducono resistenza agli NNRTI, in fucsia i residui che inducono resistenza agli NRTI nei sottodomini dita (*fingers*) e palmo (*palm*) (Das and Arnold, 2013).

Farmaci inibitori della trascrittasi inversa (classe NRTI)

I farmaci della classe degli analoghi nucleosidici e nucleotidici (NRTI) hanno un meccanismo d'azione simile tra loro. Una volta processati all'interno della cellula infettata, gli NRTI non bloccano l'attività della RT, ma piuttosto agiscono come terminatori della catena nucleotidica nascente.

Un farmaco NRTI è convertito in un analogo dei dNTP naturali tramite una cascata di fosforilazioni operate dalle chinasi cellulari. Ora la RT incorpora cataliticamente il farmaco come NRTI monofosfato all'estremità 3' della catena di DNA virale nascente. Un pirofosfato viene rilasciato come scarto della reazione di incorporazione. Gli analoghi di nucleotidici, come il tenofovir, necessitano dell'aggiunta dei β e γ -fosfati, mentre i NRTI analoghi nucleosidici necessitano di essere elaborati con l'aggiunta di tutti e tre gli α , β e γ -fosfati. L'efficienza con cui gli NRTI vengono convertiti a livello intracellulare nella forma NRTI-trifosfato è essenziale per l'efficacia del farmaco stesso. Una volta incorporato nella catena di DNA virale nascente, l'NRTI inibisce l'ulteriore elongazione del DNA virale poiché i farmaci NRTI non possiedono il gruppo 3'-OH e/o contengono modifiche alla porzione zuccherina che prevengono l'incorporazione del nucleotide successivo.

Tuttavia, la RT possiede l'abilità di rimuovere alcuni NRTI dalla catena nucleotidica nascente, invertendo la direzione della reazione catalitica della polimerizzazione (Arion *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1998).

Fanno parte di questa classe di farmaci ad azione antiretrovirale su HIV-1 (tra parentesi abbreviazione):

Analoghi nucleosidici (o NRTI):

<i>Analoghi dell'adenosina</i>	<i>Analoghi della citosina</i>	<i>Analoghi della guanina</i>	<i>Analoghi della timina</i>
- Didanosine (ddI)	- Emtricitabine (FTC) - Lamivudine (3TC) - Zalcitabine (ddC)	- Abacavir (ABC)	- Stavudine (d4T) - Zidovudine (AZT)

Analoghi nucleotidici (o NtRTI):

- Tenofovir (TDF)

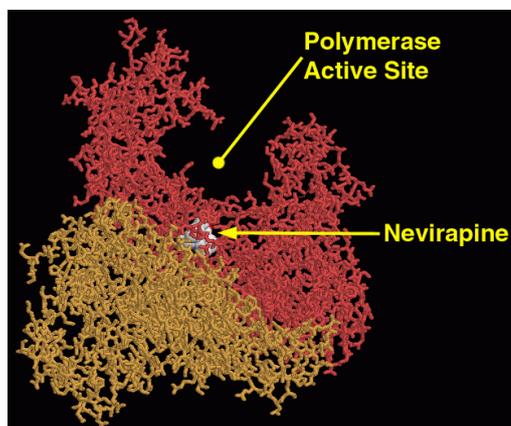
Farmaci inibitori della trascrittasi inversa (classe NNRTI)

Diversamente dai farmaci della classe NRTI che non inibiscono direttamente la RT, un farmaco della classe degli analoghi non-nucleosidici della trascrittasi inversa si lega ad una tasca idrofobica nel sottodominio “palmo”, adiacente alla base del “pollice”, inibendo allostericamente la polimerizzazione del DNA (**Figura XIV**). La tasca riconosciuta dagli NNRTI permette di disegnare inibitori altamente specifici, con bassa tossicità e minimi effetti collaterali. Gli NNRTI, infatti, sono HIV-1 specifici, tant'è vero che non hanno alcuna attività inibitoria sulla RT del virus HIV-2. La tasca idrofobica non ha necessità mantenersi altamente conservata, in quanto l'attività enzimatica viene mantenuta, a differenza delle mutazioni sul sito attivo nel sito di legame dei dNTP della RT. Pertanto HIV-1 ha una barriera genetica relativamente bassa per sviluppare resistenza ai NNRTI, rispetto alle mutazioni che portano alla NRTI-resistenza.

I farmaci appartenenti alla classe degli NNRTI attualmente in commercio e disponibili nella pratica clinica sono cinque (tra parentesi abbreviazione e nome commerciale):

- Nevirapine (NEV, Viramune[®])
- Efavirenz (EFV, Sustiva[®])
- Delavirdine (DLV Rescriptor[®])
- Etravirine (ETR, Intelence[®])
- Rilpivirine (RPV, Edurant[®])

Solitamente, nella pratica clinica un NNRTI è sempre impiegato in combinazione con due NRTI. Questo è possibile in quanto le due classi di inibitori della trascrittasi inversa virale hanno meccanismi d'azione che non si sovrappongono e mutazioni di farmacoresistenza diverse. Gli NNRTI sono inoltre importante nel bloccare la trasmissione faterno-fetale dell'infezione, mentre alcuni NNRTI sono in trial clinico per l'uso come potenziali farmaci microbici per prevenire la trasmissione sessuale (Malcolm *et al.*, 2012).



per l'uso come potenziali farmaci microbici per prevenire la trasmissione sessuale (Malcolm *et al.*, 2012).

Figura XIV: Sito di binding dei farmaci della classe NNRTI (PDB 1JLB). La nevirapina (in bianco) si colloca nella tasca idrofobica nei pressi del sito attivo della dominio polimerasico della subunità p66 (in rosso) (Goodsell, 2002).

1.3. HIV e compartimento osso

L'infezione di osteoblasti da HIV è stata documentata sia *in vitro*, sia su biopsie ossee eseguite durante l'autopsia di pazienti deceduti per AIDS (Buck *et al.*, 1990; Mellert *et al.*, 1990; Salzman *et al.*, 1993).

L'analisi istomorfometrica eseguita da Serrano *et al.* (1995) su pazienti HIV-infetti, con BMD (*Bone Mineral Density*) normale, evidenzia un livello significativamente più basso di: i) volume e consistenza della matrice osteoide (matrice organica non mineralizzata secreta dagli osteoblasti), ii) numero di osteoclasti, iii) velocità di formazione dell'osso, iv) spessore dell'osso corticale. Mentre è decisamente più elevata la velocità di rimodellamento osseo.

1.3.1. Monitoraggio del rapporto rimodellamento/riassorbimento

Sono stati individuati diversi marker per monitorare l'attività degli osteoblasti, come l'aumento di osteocalcina nel siero e della fosfatasi alcalina osso-specifica. Mentre per monitorare l'attività degli osteoclasti, vengono analizzati i livelli del C-telopeptide e del N-telopeptide del collagene di tipo I (CTX), ovvero i frammenti C- e N-terminali della molecola di collagene, proteina della matrice ossea.

Aukrust *et al.* (1999) hanno quantificato i marker sopracitati nel siero e nell'urina di 73 pazienti HIV-positivi, sotto terapia HAART, e hanno osservato che i pazienti con malattia in stadio immunologico e clinico avanzato e alta carica virale hanno alti livelli di C-telopeptide e bassi livelli di osteocalcina, che correlano con la progressiva perdita di linfociti T CD4⁺ helper.

La patogenesi della ridotta BMD in pazienti infetti da HIV dipende da più fattori. Osteopenia e osteoporosi sono lesioni dell'osso che possono correlarsi a diversi fattori di rischio, come sesso, età, scarso peso corporeo, malnutrizione, immobilità, fumo, abuso di alcool, ipogonadismo e lipodistrofia (Sambrook and Cooper, 2006).

Sommare questi fattori di rischio, a infezione da HIV e effetti collaterali della HAART, può determinare l'insorgenza di lesioni ossee in pazienti HIV positivi (Borderi *et al.*, 2009).

1.3.2. Lesioni ossee correlate a infezione da HIV e HAART

Osteopenia	Riduzione della densità minerale ossea (BMD) che prelude l'assottigliamento osseo. Questo evento precede l'insorgenza della osteoporosi
Osteoporosi	Riduzione della massa ossea e della resistenza dell'osso, con conseguente aumento del rischio di fratture spontanee o traumatiche e sconvolgimento della microarchitettura dell'osso
Osteomalacia	Mancata mineralizzazione dell'osso e conseguente ammorbidimento
Osteonecrosi	Morte del tessuto osseo per scarsa perfusione sanguigna

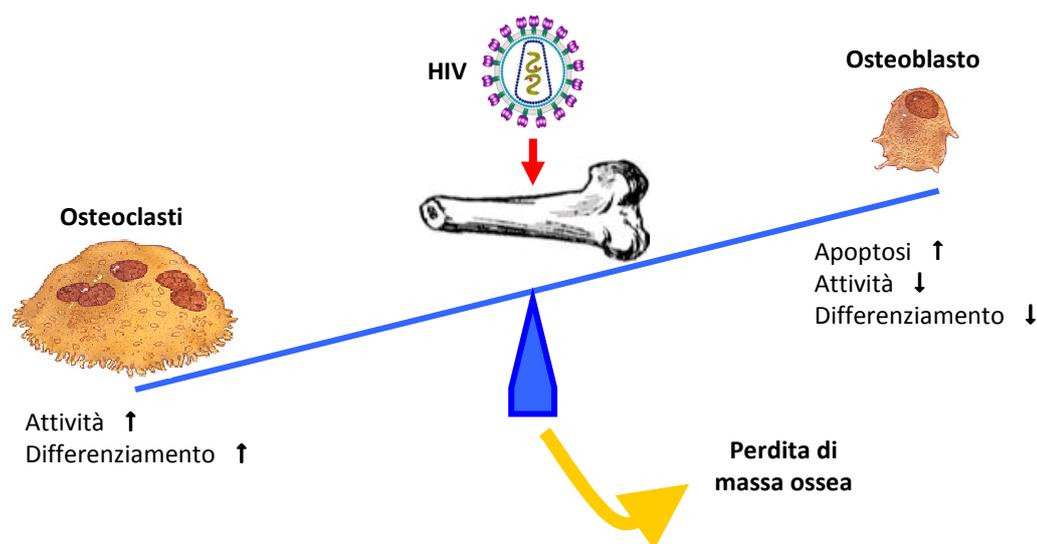


Figura XV: Rappresentazione schematica dell'alterazione dell'equilibrio omeostatico osseo nel corso di infezione da HIV-1.

La **Figura XV** riassume ciò che accade nel corso dell'infezione di HIV-1 a livello del microambiente osseo: l'equilibrio risulta compromesso a causa dell'incremento del differenziamento degli osteoclasti e dell'inibizione dell'attività degli osteoblasti e attivazione dell'apoptosi di questi ultimi.

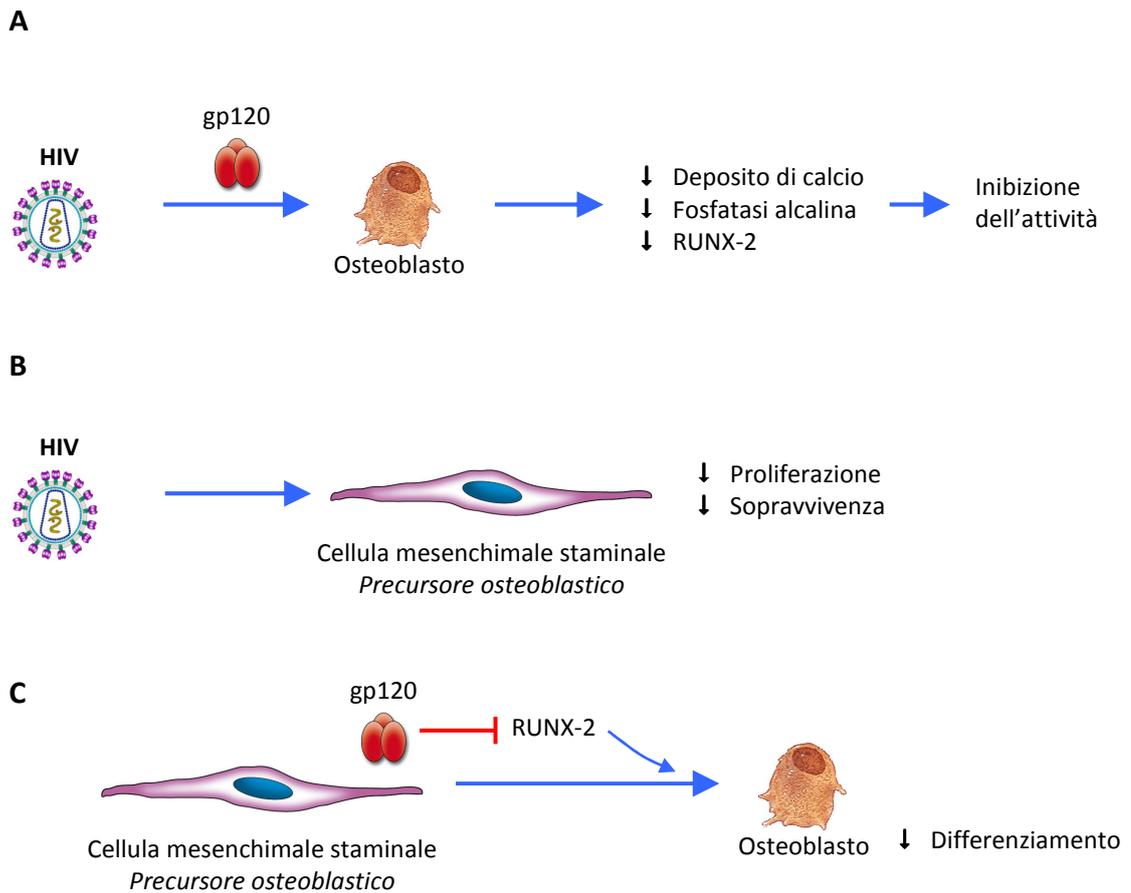


Figura XVI: Rappresentazione schematica degli effetti dell'interazione tra HIV-1 e gli osteoblasti. A) B) L'interazione tra HIV-1 e le cellule mesenchimali staminali, progenitrici degli osteoblasti, provoca un'inibizione della sopravvivenza e proliferazione con meccanismi diretti e indiretti. C) Gp120 di HIV-1 induce l'inibizione della proteina RUNX-2 e l'attivazione di PPAR- γ con uno spostamento del differenziamento delle cellule mesenchimali dagli osteoblasti verso adipociti.

1.4. Sintesi di endonucleasi chimeriche per terapia genica

1.4.1. Classificazione delle endonucleasi

Le endonucleasi, o enzimi di restrizione, sono tradizionalmente classificati in quattro classi, sulla base della loro composizione e struttura terziaria, sito di taglio, specificità di sequenza bersaglio e cofattori necessari (Pingoud and Jeltsch, 2001).

Gli enzimi di tipo I rappresentano enzimi di particolare interesse biochimico. Sono combinazioni complesse, composte da multisubunità, di enzimi di restrizione e modifica, che tagliano il DNA in modalità random, a grande distanza rispetto alla propria sequenza riconosciuta.

Gli enzimi di tipo II rappresentano una famiglia di proteine, pur tuttavia non mostrando relazioni di alcun tipo l'una con l'altra. Tagliano il DNA in posizioni ben precise, vicino o all'interno della propria sequenza riconosciuta. Fanno parte di questa categoria gli enzimi di restrizione più diffusi come strumenti di ricerca, ad esempio HindIII e NotI. In maggior parte riconoscono sequenze di DNA simmetriche, poiché legano il DNA come omodimeri. Esistono tuttavia eccezioni, come BbvCI, che riconoscono sequenze asimmetriche, poiché legano il DNA come eterodimeri. Alcuni riconoscono sequenze continue, composte da due emisequenze, come EcoRI (5'-GAATTC-3'), mentre altri riconoscono sequenze discontinue, come BglII (5'-GCCNNNNNGGC-3'), dove le emisequenze sono separate.

Tuttavia, i gli enzimi di restrizione più comuni in natura appartengono alla categoria di tipo IIS, come FokI (5'-GGATG-3'), che tagliano esternamente alla sequenza di DNA riconosciuta. Questi enzimi sono di medie dimensioni, tra i 400 e i 650 aminoacidi di lunghezza, e sono in grado di riconoscere sequenze continue e asimmetriche. Sono composti da due domini distinti, uno per il legame del DNA e l'altro per il taglio della sequenza nucleotidica. Per la maggior parte riconoscono il DNA in forma di monomeri, ma operano il taglio solamente a seguito della dimerizzazione del dominio di taglio. Per questo motivo, alcuni enzimi del tipo IIS sono più attivi se la molecola di DNA bersaglio contiene più siti di riconoscimento dello stesso enzima.

Anche gli enzimi di tipo III sono combinazioni di enzimi di restrizione e modifica, in diverse combinazioni. Operano il taglio esternamente alle rispettive sequenze riconosciute e necessitano di due sequenze con orientamento opposto sulla medesima molecola di DNA per poter operare il taglio.

L'ultima categoria, il tipo IV, è composta da enzimi che riconoscono DNA modificato, solitamente metilato, come i sistemi McrBC e Mrr di *E. coli*.

1.4.2. FokI

L'enzima di restrizione FokI, una endonucleasi batterica di tipo IIS, riconosce la sequenza non palindromica 5'-GGATG-3' in dsDNA, operando un taglio a 9/13 nucleotidi a valle del sito di riconoscimento (Sugisaki and Kanazawa, 1981; Szybalski *et al.*, 1991). FokI non riconosce nessuna precisa sequenza nella regione di DNA coperta dal sito di taglio. Ciò implica la presenza di due distinti domini proteici che compongono la proteina FokI: il primo per il riconoscimento sequenza-specifico del DNA e il secondo per l'attività endonucleasica. Una volta che il dominio di legame col DNA si è ancorato al sito di riconoscimento, viene trasmesso un segnale al dominio endonucleasico, probabilmente con un cambiamento conformazionale (Wah *et al.*, 1998) e avviene il taglio.

Data la sua natura modulare, l'enzima FokI ben si presta ad essere ingegnerizzato, sostituendo il dominio di riconoscimento del DNA con domini che riconoscano altre specifiche sequenze (Durai *et al.*, 2005), creando in questo modo delle nucleasi chimeriche.

Struttura di FokI

Wah *et al.* (Wah *et al.*, 1997, 1998) hanno analizzato la struttura cristallina di FokI e FokI legato al proprio sito di riconoscimento, a conferma della natura modulare dell'enzima FokI. Il dominio endonucleasico sembra essere bloccato dal dominio di riconoscimento attraverso un'interazione proteina-proteina, confermando il dato dell'analisi del DNA foot-printing (Li *et al.*, 1993; Yonezawa and Sugiura, 1994).

Successivi studi hanno evidenziato come il rilascio del dominio endonucleasico dal dominio di riconoscimento, consenta al primo di muoversi e posizionarsi alla

distanza di 9/13 nucleotidi dal sito di riconoscimento. Il taglio avviene solamente quando FokI si trova legato al suo sito di riconoscimento e vi è presenza di ioni magnesio. Altri studi sul meccanismo di taglio di FokI hanno mostrato che la dimerizzazione del dominio endonucleasico è necessaria a FokI per produrre un taglio su entrambi i filamenti di DNA (DSBs) (Bitinaite *et al.*, 1998).

Con riferimento alla **figura XVII**, il dominio di riconoscimento è costituito a sua volta da tre sottodomini D1, D2, e D3 evidenziati in magenta, verde e bianco, ciascuna formata da un motivo elica-giro-elica. Il sottodominio D1 si colloca nel solco maggiore della doppia elica di DNA, all'estremità 3' della sequenza riconosciuta (GGATG), il sottodominio D2, invece, contatta l'estremità 5' (GGATG), mentre D3 non è coinvolto nell'interazione proteina-DNA, ma nell'interazione proteina-proteina. Il dominio endonucleasico che opera il taglio è evidenziato in azzurro. È collegato al dominio di riconoscimento per mezzo di un segmento di connessione (linker) evidenziato in rosso. La dimerizzazione è mediata dalle due α -eliche parallele $\alpha 4$ e $\alpha 5$ del dominio endonucleasico. La superficie totale coinvolta nell'interfaccia di dimerizzazione è insolitamente piccola (800\AA^2), questo potrebbe spiegare il perché FokI sia in forma monometrica quando in soluzione (Pingoud and Jeltsch, 2001).

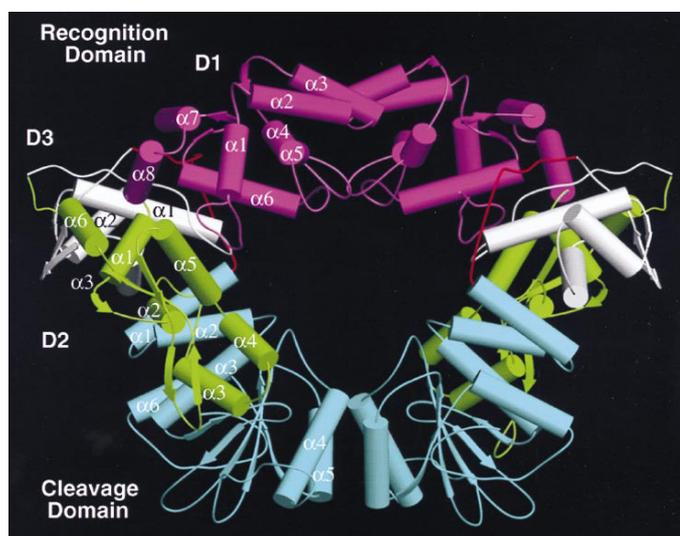


Figura XVII: Struttura dell'omodimero di FokI, PBD 2FOK (Wah *et al.*, 1998).

La **figura XVIII**, invece, mostra il cambiamento conformazionale che avviene nell'enzima FokI dopo il legame con la sequenza di DNA bersaglio. Le due picco-

le frecce rosse indicano il punto in cui deve avvenire il taglio, 9/13 nucleotidi a valle del sito di riconoscimento, mentre la freccia blu indica il movimento compiuto dal dominio catalitico (in azzurro) di FokI. Questo preciso movimento è imputabile al cambiamento conformazionale che avviene nel linker (in rosso). Quando FokI non è legato al DNA, il linker ha una struttura secondaria a *random coil*. Quando invece FokI è legato al suo bersaglio, il linker assume una conformazione più rigida, ad α -elica, posizionando correttamente il sito catalitico.

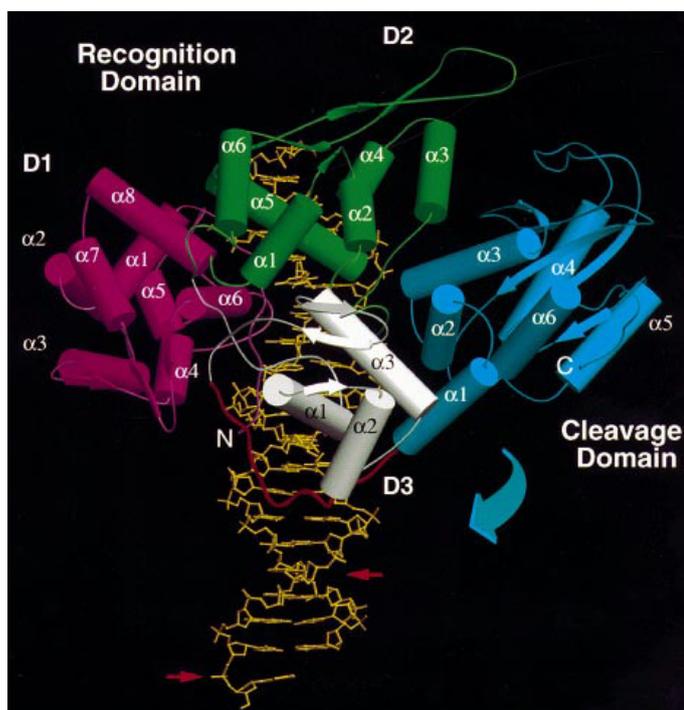


Figura XVIII: Struttura cristallina dell'enzima FokI completo (579 aminoacidi) legato al DNA, PBD 1FOK (Wah *et al.*, 1997).

FokI e le Zinc-finger nucleasi

Data la propria natura modulare, con domini indipendenti, l'enzima FokI è stato scelto per la costruzione di Zinc-finger nucleasi. Recentemente questa tecnologia ha visto un forte miglioramento, riducendo sensibilmente la frequenza di tagli endonucleolitici al di fuori della sequenza bersaglio (Davis and Stokoe, 2010). Nell'idea iniziale di questa tecnologia, infatti, ciascuna componente della coppia di Zinc-finger nucleasi poteva omodimerizzare, ciò implicava una scarsa selettività dei targets genomici, che si otteneva solamente con l'eterodimero. Inoltre, il margine di tolleranza

di 1-2 bp di ciascuno Zinc-finger incrementa enormemente il numero di possibili bersagli diversi dal sito specifico nel caso di omodimerizzazioni (Beumer *et al.*, 2006).

L'analisi della struttura cristallina del dimero di FokI ha permesso di identificare gli aminoacidi che formano l'interfaccia di dimerizzazione naturale dell'enzima. Miller *et al.* (2007) hanno mostrato come la mutazione di due aminoacidi, in ciascun dominio coinvolto nella dimerizzazione (E490K/I538K e Q486E/I499L), riduca fortemente l'attività come omodimero, favorendo invece l'attività dell'eterodimero. Szczepek *et al.* (2007) hanno utilizzato un approccio simile, identificando coppie mutanti di FokI che agivano preferenzialmente come eterodimeri. Come predetto, l'eterodimerizzazione dei mutanti di FokI mostrava una ridotta attività catalitica al di fuori del target genomico prescelto.

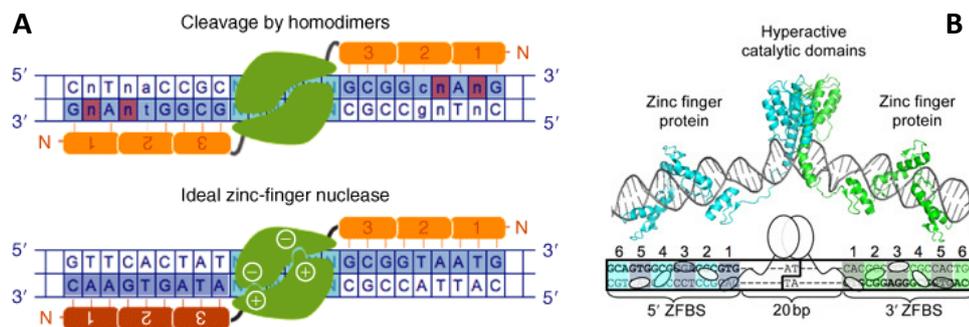


Figura XIX: A) Rappresentazione schematica dell'eterodimero di Zinc-finger nucleasi (Cathomen and Keith Joung, 2008), B) Rappresentazione in 3D dell'eterodimero Zinc-finger nucleasi e collocazione spaziale del dominio catalitico (Gordley *et al.*, 2009).

1.5. Reservoirs di infezione

Il trattamento dell'infezione da HIV-1 con la terapia antiretrovirale ad alta attività (HAART) è effettivamente in grado di ridurre i livelli plasmatici dell'RNA virale nei pazienti in trattamento, fino a valori al di sotto degli strumenti diagnostici (<20 copie/ml di HIV-1 RNA) (Pascual-Pareja *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2009). L'effettiva soppressione della carica viremica ha portato, inizialmente, ad ipotizzare una possibile eradicazione dell'infezione nell'arco di pochi anni di terapia HAART (Perelson *et al.*, 1997).

Forme episomiali di HIV-1: 1-LTR e 2-LTR

La persistenza dell'infezione virale solitamente è dovuta al suo DNA. Il DNA provirale di HIV-1 ha tre principali conformazioni, ciascuna peculiare di una precisa fase dello sviluppo dell'infezione: 1) forma lineare non-integrata, 2) forma circolarizzata non integrata, 3) provirus integrato. Nei pazienti con infezione cronico non in terapia HAART, la forma 2-LTR è stabile, mentre nei pazienti che rispondono bene al trattamento è stato dimostrato essere più bassa (Brussel *et al.*, 2003). Sebbene la forma integrata del virus sia quella con l'emivita maggiore (Ibáñez *et al.*, 1999; Siliciano *et al.*, 2003), non v'è accordo in letteratura riguardo l'emivita delle forme non-integrate del cDNA virale, per taluni molto breve (Koelsch *et al.*, 2008; Sharkey *et al.*, 2000), per altri estremamente lunga (Butler *et al.*, 2002; Pierson *et al.*, 2002).

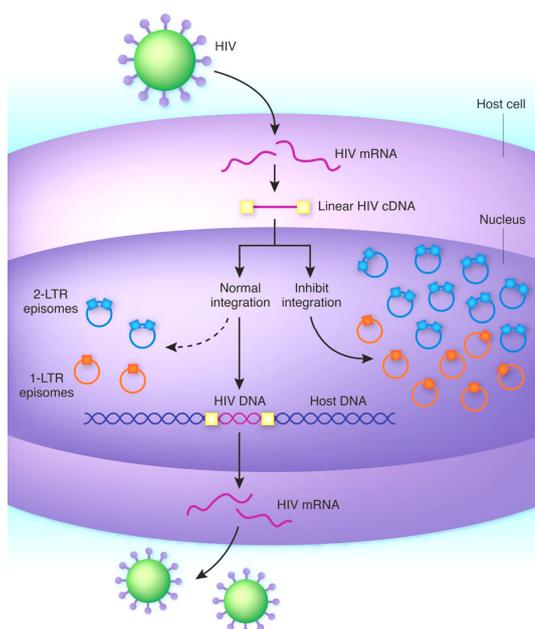


Figura XXI: Rappresentazione schematica delle tre principali conformazioni del cDNA di HIV-1 (Schacker, 2010).

La forma circolare non integrata può essere ulteriormente sottoclassificata in forme 1-LTR e 2-LTR, a seconda del numero di LTR che troviamo nella forma circolarizzata del DNA virale (**Figura XXI**). Durante il normale processo di integrazione, il meccanismo di DNA repair della cellula ospite circolarizza una piccola porzione del cDNA di HIV in episomi, con una o due copie degli LTR virali. Se l'integrazione viene bloccata con un farmaco inibitore dell'integrasi (classe InI, ad esempio raltegra-

vir), si formerà un maggior numero di forme episomiali non-integrate 1-LTR e 2-LTR. Buzón *et al.* (2010) hanno quantificato la forma circolarizzata 2-LTR in pazienti che ricevevano la terapia antiretrovirale, evidenziando come i pazienti in terapia con l'inibitore dell'integrasi, raltegravir, avessero un numero maggiore di copie di 2-LTR rispetto al gruppo di controllo.

In un altro studio, Zhu *et al.* (2011) hanno quantificato il DNA di HIV-1 totale, forma 2-LTR e integrato nell'arco di 12 settimane dall'inizio della terapia antiretrovirale in 20 pazienti mediante qRT-PCR. Come mostrato in **figura XXII-B**, la forma 2-LTR ha evidenziato una rapida alterazione durante le prime 12 settimane di trattamento, con un picco alla quarta settimana di trattamento. Diversamente dalla forma 2-LTR, il DNA virale totale e integrato è rimasto pressoché inalterato (**Figura XXII A-C**).

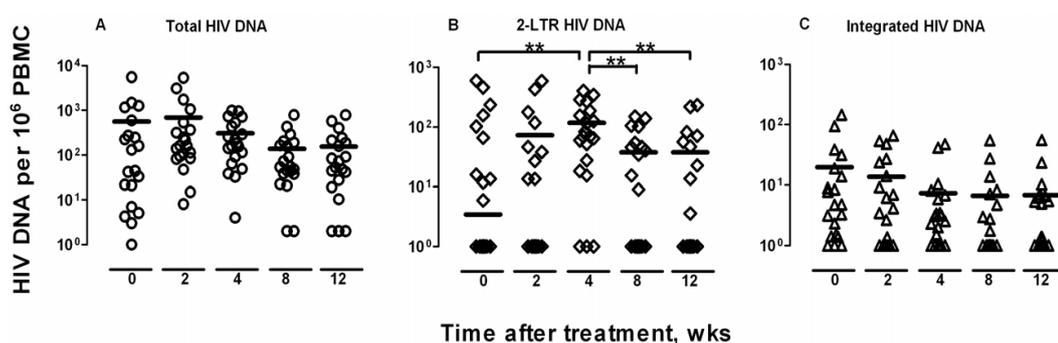


Figura XXII: Osservazione nell'arco di 12 settimane dall'inizio della terapia HAART di 20 pazienti. Quantificazione del DNA provirale totale, nella forma 2-LTR e integrata. Le linee orizzontali indicano in valore mediano della popolazione. ** p-values < 0,01 (Zhu *et al.*, 2011).

Ad oggi, l'esistenza di questi reservoirs di infezione è riconosciuta come il principale scoglio per la definitiva eradicazione del virus HIV-1 (Richman *et al.*, 2009)

2. OBIETTIVO

L'obiettivo di questa tesi e, più in generale, di questi tre anni di dottorato appena conclusi, è studiare in modo approfondito il virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1), in relazione alle profonde alterazioni sistemiche che induce nell'organismo del paziente HIV-infetto, con un particolare accento sulle alterazioni a carico del sistema scheletrico.

La problematica presa in esame è estremamente vasta e sono diversi i fronti su cui si combatte la lotta all'AIDS. In primo luogo v'è il *management* del paziente HIV-infetto, il quale mostra un evidente invecchiamento precoce. Questa problematica è particolarmente evidente a livello dell'osso. Il tasso di incidenza di osteopenia/osteoporosi, nei pazienti HIV-positivi, è infatti drammaticamente più elevato rispetto alla popolazione sana (Borderi *et al.*, 2009; Brown and Qaqish, 2006). Studi clinici hanno permesso di evidenziare come alcune classi di farmaci più di altre, ad esempio inibitori della proteasi di HIV-1, portino alla compromissione dell'omeostasi ossea, con conseguente alterazione dell'architettura interna all'osso, aumento del rischio di fratture e conseguenti gravi problematiche per il paziente HIV-positivo. In nostro studio (Focà *et al.*, 2012) prevedeva un follow-up di 12 mesi di pazienti naïve per la terapia antiretrovirale e il monitoraggio di diversi markers ossei a seguito dell'inizio della terapia HAART. I risultati ottenuti hanno evidenziato un generale incremento di diversi markers di attività del microambiente osseo, come PTH, osteocalcina, OPG e CTx. Questi risultati confermano l'impatto della terapia antiretrovirale sul turnover osseo, che risulta sensibilmente aumentato nei pazienti in terapia rispetto alla popolazione sana.

Parallelamente all'azione diretta del virus sul compartimento osseo, diversi studi clinici hanno messo in evidenza un danno all'osso dovuto alla terapia antiretrovirale HAART, in particolare alle due componenti cellulari principali dell'omeostasi ossea: osteoblasti e osteoclasti (Landonio *et al.*, 2004; Mora *et al.*, 2007). Il nostro studio è stato focalizzato su uno dei due attori principali dell'omeostasi ossea: gli osteoblasti. Questo tipo cellulare regola, infatti, la sintesi di nuova matrice ossea, in contrapposizione agli osteoclasti, che mediano il riassorbimento osseo. Gli esperimenti condotti sul modello cellulare osteoblastico umano (cellule HOBIT) mettono in evi-

denza come il trattamento con determinati farmaci, in particolare inibitori della proteasi virale, porti ad apoptosi nel caso in cui vi sia un aumento di concentrazione del farmaco rispetto a quella fisiologica. Tuttavia già a concentrazioni fisiologiche è possibile riscontrare un trend negativo nella regolazione di alcuni marker ossei, come fosfatasi alcalina e osteocalcina, che sono invece conservati a livelli fisiologici nel caso di trattamento con nuovi farmaci, con meccanismo d'azione differente, ad esempio inibitori dell'entry o dell'integrasi di HIV-1.

Infine esiste la problematica dell'eradicazione del virus dai *reservoirs* di infezione. La terapia HAART riesce, infatti, a controllare l'infezione, mantenendo i livelli di viremia residua sotto controllo. Ciò nonostante molti studi propongono diversi citotipi come potenziali *reservoir* di infezione, vanificando, in una certa misura, l'effetto della terapia antiretrovirale che, se interrotta, porta ad una riattivazione dell'infezione. In taluni casi, si assiste a fenomeni di riattivazione di questi *reservoirs* di infezione, in coincidenza di *blip* viremici (Geeraert *et al.*, 2008). Tra questi potenziali *reservoirs* di infezione ritroviamo anche le cellule mesenchimali staminali umane, precursori degli osteoblasti (Gibellini *et al.*, 2011). Per questa ragione, abbiamo sviluppato un nuovo approccio molecolare alla problematica dell'eradicazione: sfruttare l'integrasi virale per colpire il virus integrato nel genoma cellulare, causa della formazione dei *reservoirs* di infezione. La proteina virale integrasi è responsabile dell'integrazione del cDNA provirale nel genoma dell'ospite, operazione che avviene tramite riconoscimento specifico delle regioni LTR, sequenze esterne del genoma provirale, da parte della stessa integrasi. Sfruttando la capacità dell'integrasi di riconoscere in modo selettivo le sequenze LTR virali, abbiamo creato una proteina chimerica, formata dall'integrasi di HIV-1 e dal sito catalitico dell'endonucleasi FokI. I diversi cloni generati sono stati transfettati stabilmente in una linea T linfoblastica CD4+ (cellule Jurkat) suscettibile all'infezione con HIV-1. Una volta infettate, abbiamo ottenuto in questo sistema cellulare una significativa riduzione della proteina p24 e del RNA genomico di HIV. Successivamente questi cloni sono stati transfettati in una linea T linfoblastica CD4+ che portano integrata nel proprio genoma una sola copia del DNA virale di HIV-1 (cellule 8E5/LAV). Studiandole come modello di HIV integrato, abbiamo ottenuto risultati molto incoraggianti poiché, dopo una transfezione stabile con i cloni chimerici, i markers di infezione, come il DNA virale integrato, sono risultati estremamente

ridotti con tre cloni. Questo ci consente di ipotizzare un danno diretto dei due cloni sul provirus, danneggiandolo prima dell'integrazione, ma anche un'azione diretta di tre cloni sul provirus integrato. La determinazione di un mezzo molecolare per eliminare il genoma di HIV che funge da *reservoir* rappresenta un obiettivo ambizioso che, se realizzato, porterebbe il gruppo a una importante osservazione.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Studio di popolazione su coorte di pazienti naïve per la terapia

Popolazione e criteri di inclusione

Questo studio multicentrico randomizzato è stato condotto su 91 pazienti che all'arruolamento non mostravano segni di patologie croniche renali, per valutare le funzionalità renali dopo il trattamento HAART, che prevedeva un backbone terapeutico di tenofovir diisoproxil fumarato (TDF) (Fung *et al.*, 2002) più emtricitabina (FTC) (Richman, 2001), entrambi farmaci inibitori nucleosidici della trascrittasi inversa virale (NRTI). Questi due farmaci vengono somministrati con un'unica compressa che prende il nome di truvada (TVD). Al backbone di TVD è stato associato in un braccio dello studio l'atazanavir (ATV) (Sanne *et al.*, 2003), farmaco inibitore della proteasi virale (PI), boosterato con ritonavir (/r) (Zeldin and Petruschke, 2004), farmaco della classe dei PI in grado di aumentare l'assorbimento degli altri farmaci co-somministrati inibendo il citocromo P450 3A4 (CYP3A4) (Zeldin and Petruschke, 2004); all'altro braccio dello studio invece è stato associato al TVD l'efavirenz (EFV) (Elion *et al.*, 1999), farmaco analogo non-nucleosidico inibitore della retrotrascrittasi virale (NNRTI).

Al momento dell'arruolamento sono stati rilevati diversi parametri: storia clinica del paziente, CD4 nadir, HIV RNA (*branched chain DNA-enhanced label amplification assay*, Quantuplex 2-0; Chiron, con cut-off a 50 copie/ml) e rilevazione sierologica di HBV e HCV. Durante il periodo di follow-up sono stati ripetuti conta di linfociti T CD4+, quantificazione della viremia, e test laboratoristici di routine (compresa l'analisi di creatinina ed elettroliti). I campioni di plasma sono stati prelevati dai pazienti e sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Quantificazione dei markers con test ELISA

Per dosare i diversi markers oggetto di studio è stata impiegata una metodica immunoenzimatica: l'osteocalcina (OC), crosslaps (CTx) e 1,25-(OH)₂ vitamina D (VitD) sono stati determinati con kit IDS (Bardon, UK); osteoprotegerina (OPG) e il ligando del recettore di attivazione di NFκB (RANKL) sono stati determinati con kit

Peprtech (London, UK); infine l'ormone paratiroideo (PTH) è stato determinato con kit DIA source ImmnoAssays S.A. EIA kit (Nivelles, Belgium). Tutti i tests sono stati eseguiti seguendo le istruzioni del produttore. La quantificazione delle citochine è stata eseguita mediante retta di regressione della curva standard di calibrazione (Microsoft Excel, 2003, Redmond, Washington).

Gli intervalli di normalità considerati per i diversi markers sono stati: OC nelle donne 8,4-33,9 ng/ml, negli uomini 9,6-40,8 ng/ml; CTx nelle donne 0,112-0,738ng/ml, negli uomini 0,115-0,748ng/ml. Il cut-off per l'iperparatiroidismo è stato fissato a 65pg/ml e la carenza di vitamina D è stata fissata per valori inferiori a 11pg/ml. Intervalli di normalità per OPG e RANKL validati clinicamente attualmente non esistono ancora.

Analisi statistica

Statistiche descrittive sono state calcolate per le variabili quantitative (media, mediana, deviazione standard, range interquartile) e per le variabili qualitative (frequenze assolute e percentuali). Le differenze tra la quantificazione all'arruolamento e a 48 settimane post-inizio della terapia sono state calcolate per ogni marker come $\Delta[\text{wk 48-bl}]$.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il software SPSS (Versione 20.0 per Windows, IBM Corp., Armonk, NY). Tutti i p-values sono stati ottenuti con test a 2 code e considerati significativi solo se $p < 0,05$.

3.2. STUDIO DEGLI EFFETTI DELLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE CONVENZIONALE SU I LIVELLI APOPTOTICI E PROFILO DI ESPRESSIONE DI MARKERS DEL METABOLISMO OSSEO NELL LINEA OSTEOLASTICA HOBIT

Colture cellulari e trattamento coi farmaci

La linea cellulare osteoblastica HOBIT è stata mantenuta in coltura con terreno DMEM/F12 (Gibco, Paisley, UK) con il 2% di siero fetale bovino (FBS; Gibco), antibiotici e aminoacidi (Baldini *et al.*, 2008; Gibellini *et al.*, 2008). Le cellule, una volta raggiunta una confluenza circa del 70%, sono state trattate con diversi farmaci a

diverse concentrazioni scalari (C1, C2 e C3): C2 è la concentrazione media ed è considerata quella ottimale, poiché equivale alla concentrazione plasmatica di ciascun composto nel plasma di pazienti HIV-positivi in trattamento (Datapharm Communications Ltd. The Medicines Compendium, 2008). C1 rappresenta la concentrazione minore tra quelle testate, ovvero 5 volte inferiore a C2, mentre C3 rappresenta la concentrazione maggiore, ovvero 5 volte superiore a C2.

Sono stati testati i seguenti composti: farmaci inibitori della proteasi virale (PI): indinavir, IDV (Shankar *et al.*, 2005), darunavir, DRV (Tanaka *et al.*, 2013), tipranavir, TPV (Mikl *et al.*, 2009), fosamprenavir, FPV (Eron *et al.*, 2006), saquinavir, SQV (Ranganathan and Kern, 2002), atazanavir, ATV (Sanne *et al.*, 2003), nelfinavir, NFV (Perry and Benfield, 1997) e ritonavir, RTV oppure /r (Moyle and Back, 2001); farmaci analoghi non-nucleosidici inibitori della trascrittasi inversa virale (NNRTI): nevirapina, NEV (Montaner JG *et al.*, 1998) ed efavirenz, EFV (James, 1998); farmaci analoghi nucleosidici inibitori della trascrittasi inversa virale (NRTI): tenofovir, TEN (Kearney *et al.*, 2006), emtricitabina, FTC (Oxenius *et al.*, 2002); farmaci inibitori dell'entry virale (EI): maraviroc, MVC (Meanwell and Kadow, 2007); farmaci inibitori dell'integrasi virale: raltegravir, RAL (Steigbigel *et al.*, 2008). Tutti i farmaci testati sono stati acquistati presso il *repository* NIBSC (Centre for AIDS Reagents, NIBSC, Londra, UK).

Dosaggio di OPG e RANKL nel surnatante di coltura

I surnatanti delle colture cellulari sono stati raccolti a 24 e 48 ore post-trattamento e conservati a -80°C fino al momento del test. Per il dosaggio delle due citochine sono stati utilizzati due kit per test immunoenzimatici commerciali, RANKL detection kit (Peprotech, London, UK) e Duo ELISA OPG kit (R&D, Minneapolis, MN). L'analisi è stata eseguita seguendo le istruzioni del produttore. Il controllo negativo dei test era rappresentato da cellule HOBIT non trattate e mantenute in coltura nelle medesime condizioni di quelle trattate con i farmaci. La quantificazione di OPG e RANKL è stata eseguita mediante retta di regressione della curva standard di calibrazione (Microsoft Excel, 2003, Redmond, Washington).

Analisi dell'apoptosi nelle cellule HOBIT

L'analisi dell'apoptosi è stata eseguita mediante marcatura con propidio ioduro (Gibellini *et al.*, 2012a). Le cellule sono state trattate con tripsina (Gibco) per distaccarle dal fondo delle piastre di coltura, lavate con PBS e centrifugate 4 minuti a 4000rpm, quindi risospese in etanolo 70% e conservate a 4°C per almeno 60 minuti. Successivamente allo step di fissaggio, le cellule sono state nuovamente lavate con PBS e trattate con 0,5mg/ml di RNasiA (Roche, Mannheim, Germany) per 1 ora a 37°C. Quindi le cellule sono state ulteriormente lavate e risospese in una soluzione di propidio ioduro (PI; concentrazione finale 50mg/ml in PBS, Sigma) e, dopo un'incubazione di 10' al buio, letti al citometro a flusso (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Palo Alto, CA). L'analisi dei campioni e la quantificazione dell'apoptosi sono state eseguite con software CellQuest (Becton-Dickinson).

Tutti gli esperimenti di apoptosi riportati sono espressi come media percentuale \pm deviazione standard (SD) di tre esperimenti separati condotti in duplicato. Tutti i p-values riportati sono riferiti al test di Mann-Whithney, ottenuti con test a 2 code e considerati significativi solo se $p < 0,05$. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il software SPSS (Versione 20.0 per Windows, IBM Corp., Armonk, NY).

Quantificazione in Real Time RT-PCR di diversi markers di attività e differenziamento osteoblastico

L'analisi espressione dei diversi markers ossei testati è stata eseguita mediante Real time RT-PCR (Gibellini *et al.*, 2012a). Le cellule sono state trattate con tripsina (Gibco) per distaccarle dal fondo delle piastre di coltura, lavate con PBS e centrifugate 4 minuti a 4000rpm, quindi scartato il surnatante i pellet di cellule sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'RNA. L'estrazione dell'RNA cellulare è stata eseguita utilizzando lo RNeasy® mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) seguendo il protocollo suggerito dal fornitore.

Tutte le Real Time RT-PCR sono state allestite con QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN), utilizzando il seguente profilo termico: step iniziale di 20 minuti di RT, denaturazione iniziale di 15 minuti a 95°C, seguiti da 45 cicli di amplificazione. Ciascun ciclo era costituito da uno step iniziale di denaturazione 10 secondi

a 95°C, uno step di annealing a 60°C per 15 secondi e uno step di elongazione a 72°C per 30 secondi. La fluorescenza del SYBR green è stata determinata alla fine di ciascuno step di elongazione. Infine, l'analisi della curva di melting ha confermato la corretta amplificazione di tutti i trascritti, confermati ulteriormente da corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%. I dati sono stati acquisiti ed analizzati dal software LightCycler (versione 3.5, Roche, Mannheim, Germany). La quantificazione relativa dell'espressione riportata nei grafici è stata calcolata rispetto alla subunità ribosomiale 18S, normalizzato rispetto al controllo non trattato, espressa come Log2 differenze di espressione.

Primers utilizzati in Real Time RT-PCR (Mathews *et al.*, 2011; Picot, 2005, capitolo 3):

Fosfatasi alcalina	forward 5'-CCTACACGGTCCTCCTATAC-3' reverse 5'-TGACTGCTGCCGATACTC-3'
Osteocalcina	forward 5'-AGCGAGGTAGTGAAGAGAC-3' reverse 5'-GAAAGCCGATGTGGTCAG-3'
RUNX-2	forward 5'-GGCAGTTCCCAAGCATTTC-3' reverse 5'-GCAGGTAGGTGTGGTGTG-3'
PTHR1	forward 5'-GCCAACTACAGCGAGTGTG-3' reverse 5'-GCCAGGGACACGGAGTAG-3'
18S	forward 5'-CGGCTACCACATCCAAGGAAG-3' reverse 5'-AGCTGGAATTACCGCGGCT-3'

3.3. STUDIO DI CLONI CHIMERICI INTEGRASI /FOKI NEL CORSO DI INFEZIONE DI HIV-1 E SUL GENOMA PROVIRALE INTEGRATO IN CELLULE LINFOBLASTOIDI UMANE

Costruzione dei cloni chimerici

L'integrasi di HIV-1 clade B è stata amplificata da preparato clinico HIV-1 positivo con kit GoTaq® (Promega, Madison, WI) e primers Int03/Int04, con protocollo di amplificazione standard, clonata nel vettore pCR8, con kit

pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning Kit (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) e trasformata in cellule competenti XL-10 (Agilent Technologies/Stratagene, Santa Clara, CA). Successivamente clonata nel vettore d'espressione pcDNA3.1D, con kit pcDNA[™]3.1 Directional TOPO[®] Expression Kit (Life Technologies), con l'aggiunta della tripletta ATG, al 5' della sequenza codificante per integrasi, e senza stop codon, mantenendola in frame con la porzione di plasmide codificante per l'epitopo V5 e His-tag. Il gene codificante per l'endonucleasi FokI (FokI-R) è stato isolato dall'estratto di DNA genomico di *Flavobacterium okeanokoites* (DMSZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), amplificato con kit GoTaq[®] (Promega, Madison, WI) e primers Int03/Int04 con protocollo di amplificazione standard, e clonato nel vettore pGEM-T easy (Promega). Successivamente la porzione codificante per il dominio catalitico di FokI è stata clonata nel vettore d'espressione pcDNA3.1D, con kit pcDNA[™]3.1 Directional TOPO[®] Expression Kit (Life Technologies), con l'aggiunta della tripletta ATG, al 5' della sequenza codificante per FokI-CTD, e senza stop codon, mantenendola in frame con la porzione di plasmide codificante per l'epitopo V5 e His-tag.

I cloni chimerici sono stati ottenuti amplificando le sequenze di integrasi (full length o delezioni) e FokICTD, aggiungendo all'interfaccia tra le due sequenze la sequenza codificante per il sito riconosciuto dall'endonucleasi BamHI, seguendo il protocollo standard della kit GoTaq[®] (Promega). Gli amplificati sono stati purificati con kit Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche) e digeriti con l'endonucleasi BamHI (Roche) e successivamente ligati con T4 ligasi (Promega) seguendo le istruzioni del fornitore. I costrutti chimerici sono stati nuovamente amplificati con primers Int130/Fok130 e clonati nel vettore pcDNA3.1D. La mutagenesi sito-specifica è stata realizzata tramite QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies).

Tutti i cloni sono stati verificati tramite sequenziamento e confrontati con le sequenze di riferimento nel database GeneBank: #K03455, dal nucleotide 4230 al nucleotide 5093, per HIV-1 integrasi; #M28828, dal nucleotide 3398 al nucleotide 4027, per FokI-CTD.

Primers per le clonazioni:

Integrasi (in pGEM-T easy) (Int03/Int04)	forward 5'-TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCC-3' reverse 5'-ATCCTCATCCTGTCTACTTGCCAC-3'
Integrasi (in pcDNA3.1D) (Int130/Int120)	forward 5'-CACCATGTTTTTAGATGGAATAGATAAGGCC-3' reverse 5'-CTCATGTICTTCTTGGGCCCTTATCTA-3'
FokI-R (in pGEM-T easy) (Fok8/Fok9)	forward 5'-ACGACAAGGGGCGAAAGCCAA-3' reverse 5'-AGCGGCTGATAATGCTGCTTTTCC-3'
FokI-CTD (in pcDNA3.1D) (FokCTDF/Fok130)	forward 5'-CACCATGATTCTTCAATTTGTAATACCTAATCGT-3' reverse 5'-AAAGTTTATCTCGCCGTTATTAAATTTCCGTC-3'
Integrasi- Δ_{50-288} (Int130/Int10)	forward 5'- CACCATGTTTTTAGATGGAATAGATAAGGCC-3' reverse 5'-AAAGGATCCGGCTTCTCCTTTTAGCTGACATTTA-3'
Integrasi- $\Delta_{213-288}$ (Int130/Int11)	forward 5'- CACCATGTTTTTAGATGGAATAGATAAGGCC-3' reverse 5'-AAAGGATCCTTCTTTAGTTTGTATGTCTGTTGCT-3'

Primers per le mutagenesi sito-specifiche dei residui K258A, R262A, R263A, K264A e K266A:

INT258F	5'-TTTTGCTGCTGGCACTACTGCTATGTCACTATTATCTTG-3'
INT258R	5'-CAAGATAATAGTGACATAGCAGTAGTGCCAGCAGCAAAA-3'
INT262F	5'-GATCTTTGCTTTTCTTGCTGGCACTACTTTTATG-3'
INT262R	5'-CATAAAAAGTAGTGCCAGCAAGAAAAGCAAAGATC-3'
INT263F	5'-CTAATGATCTTTGCTTTTGCTGCTGGCACTACTTTTATG-3'
INT263R	5'-CATAAAAAGTAGTGCCAGCAGCAAAAAGCAAAGATCATTAG-3'
INT264F	5'-TCCATAATCCCTAATGATCGCTGCTGCTGCTGCTGGCAC-3'
INT264R	5'-GTGCCAGCAGCAGCAGCAGCGATCATTAGGGATTATGGA-3'
INT266F	5'-CATAATCCCTAATGATCGCTGCTTTTGCTGCTGGCAC-3'
INT266R	5'-GTGCCAGCAGCAAAAAGCAGCGATCATTAGGGATTATG-3'
FokDelF	5'-CACACCACGATTAGGTATTACAAATTGAAGAATGGATC-3'
FokDelR	5'-GATCCATTCTTCAATTTGTAATACCTAATCGTGGTGTG-3'

Primers per qPCR e qRT-PCR:

HIV-1 Pol	forward 5'-TACAGGAGCAGATGATACAG-3' reverse 5'-CCTGGCTT*TAAT*TTTACTGG-3'
HLA (GH26/GH27)	forward 5'-GTGCTGCAGGTGTAAACTTGTACCA-3' reverse 5'-CACGGATCCGGTAGCAGCGGTAGAG-3'

Culture cellulari e trattamento coi farmaci

Le due linee cellulari linfoblastoidi CD4⁺ utilizzate in questo studio sono le cellule Jurkat (Schneider *et al.*, 1977) (ATCC, Manassas, VA, USA) e le cellule 8E5LAV (Folks *et al.*, 1986) (ATCC). Entrambe vengono mantenute in coltura con RPMI 1640 (Lonza, Basel, Switzerland) più 10% FBS (Gibco) e 2 mM L-glutamina (Lonza) ad una densità di $5 \cdot 10^5$ cells/ml.

Le cellule che dopo la transfezione dovranno essere selezionate vengono mantenute nelle stesse condizioni di coltura, ma con l'aggiunta dell'antibiotico di selezione G418 (Life Technologies), mantenuto sempre ad una concentrazione finale di 0,5mg/ml.

Stocks virali, infezione e dosaggio della proteina virale p24

Per questo studio è stato scelto il ceppo HIV-1_{IIIb}, ceppo di laboratorio con tropismo X4, in grado di infettare le cellule Jurkat (Tan *et al.*, 2013). Gli stock di questo virus sono stati ottenuti infettando le cellule C8166 e mantenendole per 14 giorni in coltura, al termine dei quali il surnatante contenente il virus è stato filtrato, aliquotato e stockato a -80°C (Gartner and Popovic, 1990). Gli stock virali sono stati titolati utilizzando il sistema HIV-1 gag p24 antigen ELISA kit (Biomerieux, Marcy L'Etoile, France) a 1000ng/ml di proteina p24.

Le infezioni sono state eseguite incubando per 2 ore a 37°C in una soluzione di RPMI+10% FBS contenente il virus HIV-1_{IIIb} ad una concentrazione di 5ng/ml di p24 (Bon *et al.*, 2013b). terminate le due ore di incubazione, le cellule sono state lavate per 4 volte con PBS e centrifughe da 4 minuti a 4000rpm, quindi seminate in piastre da 6 o 24 pozzetti ad una densità di $5 \cdot 10^6$ cells/ml o in RPMI + 10% FBS + 0,5mg/ml G418. Le raccolte sono state eseguite ai tempi riportati nei diversi esperi-

menti. Cellule e surnatanti raccolti sono stati conservati a -80°C fino al momento del test. Le cellule sono state passate ogni 3 giorni e seminate sempre a $5 \cdot 10^6$ cells/ml.

Generazione di cloni cellulari transfettati stabilmente

Il giorno precedente la transfezione, le cellule sono state passate e seminate alla densità raccomandata e seminate in terreno fresco. Prima della transfezione con sistema Nucleofector[®] Amaxa (Lonza), $5 \cdot 10^6$ cellule per ciascuna transfezione sono state centrifugate per 4' a 4000rpm e risospese in 100ul di buffer di transfezione, cui sono stati aggiunti 5ug di plasmide contenente la sequenza chimerica. Le cellule così risospese sono state trasferite nella cuvetta per l'elettroporazione ed elettroporate con il programma X-001. Subito dopo il termine del programma le cellule sono state trasferite in terreno pre-riscaldato a 37°C (RPMI + 10% FBS). Lo step di selezione di cloni cellulari transfettati stabilmente è cominciato 7 giorni post-transfezione.

L'efficienza di transfezione con plasmide di controllo pmaxGFP (Amaxa, Lonza) è stata valutata a 24 ore dalla transfezione con metodica di citometria a flusso (FACSCalibur).

Analisi quantitativa del DNA provirale tramite Real Time PCR (qPCR)

La quantificazione del DNA virale è stata eseguita mediante Real Time PCR. Le cellule sono state raccolte a diversi tempi, lavate in PBS, centrifugate 4' a 4000rpm e quindi scartato il surnatante i pellet di cellule sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione dell'DNA. L'estrazione dell'DNA cellulare è stata eseguita utilizzando lo DNeasy[®] mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) seguendo il protocollo suggerito dal fornitore.

Il livello di DNA provirale è stato determinato tramite Real Time PCR quantitativa con metodica SYBR Green (Gibellini *et al.*, 2004a, 2004b). I primers utilizzati sono specifici per la sequenza del gene virale Pol (Albert and Fenyo, 1990). Tutte le qPCR sono state allestite con QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN), utilizzando il seguente profilo termico: denaturazione iniziale di 15 minuti a 95°C , seguiti da 45 cicli di amplificazione. Ciascun ciclo era costituito da uno step iniziale di denaturazione 10 secondi a 95°C , uno step di annealing a 60°C per 15 secondi, uno step di elongazione a 72°C per 30 secondi e un breve step di 2 secondi a 78°C al termine del quale è stata determinata la fluorescenza del SYBR green. Infine, l'analisi della

curva di melting ha confermato la corretta amplificazione di tutti i trascritti. I dati sono stati acquisiti ed analizzati dal software LightCycler (versione 3.5, Roche, Mannheim, Germany). La quantificazione relativa dell'espressione riportata nei grafici è stata calcolata rispetto al gene *housekeeping* HLA, normalizzato rispetto al controllo non trattato, espressa come Log_{10} differenze di espressione (Shirsat *et al.*, 2010).

Analisi quantitativa del RNA provirale tramite Real Time RT-PCR (qRT-PCR)

L'analisi espressione dell'RNA virale è stata eseguita mediante Real Time RT-PCR (Gibellini *et al.*, 2012a). Le cellule sono state raccolte a diversi tempi, lavate in PBS, centrifugate 4' a 4000rpm e quindi scartato il surnatante i pellet di cellule sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'estrazione. L'RNA cellulare è stato estratto utilizzando lo RNeasy[®] mini kit (QIAGEN) seguendo il protocollo suggerito dal fornitore. I primers utilizzati sono specifici per la sequenza del gene virale Pol (Albert and Fenyo, 1990). Tutte le Real Time RT-PCR sono state allestite con QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (QIAGEN), utilizzando il seguente profilo termico: step iniziale di 20 minuti di RT, denaturazione iniziale di 15 minuti a 95°C , seguiti da 45 cicli di amplificazione. Ciascun ciclo era costituito da uno step iniziale di denaturazione 10 secondi a 95°C , uno step di annealing a 60°C per 15 secondi, uno step di elongazione a 72°C per 30 secondi e un breve step di 2 secondi a 78°C al termine del quale è stata determinata la fluorescenza del SYBR green. Infine, l'analisi della curva di melting ha confermato la corretta amplificazione di tutti i trascritti. I dati sono stati acquisiti ed analizzati dal software LightCycler (versione 3.5, Roche, Mannheim, Germany). La quantificazione relativa dell'espressione riportata nei grafici è stata calcolata rispetto alla subunità ribosomiale 18S, normalizzato rispetto al controllo non trattato, espressa come Log_2 differenze di espressione (Van Peer *et al.*, 2012).

Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD) di tre esperimenti separati, eseguiti in duplicato. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test T di Student a due code.

4. RISULTATI

4.1. LA TERAPIA HAART ALTERA IL TURNOVER OSSEO IN PAZIENTI NAÏVE GIÀ A 6 MESI DALL'INIZIO DELLA TERAPIA

Questo lavoro è stato svolto in collaborazione con il dipartimento di malattie infettive dell'Università di Brescia ed è stato pubblicato nell'anno 2012 (Focà *et al.*, 2012). Questo studio prospettico punta a analizzare diversi markers del metabolismo osseo mediante ELISA sul siero dei pazienti arruolati, valutando il ruolo della terapia antiretrovirale sulle alterazioni di questi markers.

4.1.1. Caratteristiche dei pazienti all'arruolamento

Dei 91 pazienti naïve che sono stati arruolati in questo trial, 75 sono rimasti fino al completamento del follow-up con regime HAART randomizzato. 33/75 hanno ricevuto TVD+EFV, mentre 42/75 TVD+ATV/r. Tutti i pazienti hanno raggiunto una viremia inferiore alle 50 copie/ml entro la 24^a settimana dall'inizio della terapia e hanno mantenuto questi livelli fino al completamento del follow-up. Le caratteristiche della popolazione in studio sono riportati nella **Tabella 1**. La maggioranza dei pazienti sono uomini (81,3%) e hanno contratto il virus per trasmissione sessuale, il 77,3% ha livelli di Cellule T CD4⁺>200 cells/mm³, il 25,3% dei pazienti mostrava ipofosforemia (<2,7mg/dL) e una consistente porzione (22,6%) dei pazienti soffriva di una severa deficienza di vitamina 1,25-(OH)₂ D (<11pg/ml) all'arruolamento. La media di PTH all'arruolamento era 31,0 (SD 17,7) pg/ml e considerando un cut-off di 65pg/ml, 4/75 pazienti mostravano iperparatiroidismo. I principali markers di *turnover* osseo all'arruolamento sono stati dosati e i loro valori riportati in **Tabella 1**. Da notare che RANKL era non rilevabile nell'86% dei pazienti (<63pg/ml).

Variabile	n (%)
Età, anni [media (SD)]	41.6 (11.9)
Uomini	61 (81.3)
Fattore di rischio IVDU	6 (8)
BMI (<25 Kg/m ²)	39 (52.7)
Viremia > 100.000 copie/ml	26 (34.7)
Conta cellule T CD4 < 200 cells/mm ³	17 (22.7)
CD4/CD8 ratio < 0.4	42 (56)
Fumatori	35 (46.7)
Positivi Ab HCV	11 (14.7)
CDC 93 clinical class A	46 (65.7)
HAART:	
• TVD+EFV	33 (44)
• TVD+ATV/r	42 (56)
Ipofosforemia < 2.7 mg/dL	19 (25.3)
1,25-(OH) ₂ Vitamina D < 11 pg/mL	19 (25.3)
Iperparatiroidismo (> 65 pg/mL)	4 (5.3)
eGFR creatinina * < 90 mL/min	26 (34.6)
eGFR cystatin C * < 90 mL/min	15 (20.5)
OC, ng/mL [media (SD)]	19.86 (10)
CTx, ng/mL [media (SD)]	0.43 (0.26)
OPG, ng/mL [media (SD)]	0.83 (0.41)

Tabella 1: Caratteristiche della popolazione arruolata nello studio. n numero, SD deviazione standard, IVDU intra-venous drug users, BMI body mass index, HAART highly active antiretroviral therapy, TVD trovada, ATV/r atazanavir/ritonavir, eGFR estimated glomerular filtration rate, OC osteocalcina, CTx C-terminal cross-laps, OPG osteoprotegerina.

4.1.2. Andamento dei markers di turnover osseo

Durante il follow-up è stato possibile riscontrare un incremento dei markers ossei (**Figura 1**). La differenza tra le medie all'arruolamento e a 48 settimane dall'inizio del trattamento risultano essere: 18,78 (SD 15,5) ng/ml per osteocalcina, 0,33 (SD 0,31) ng/ml per crosslaps, 0,09 (SD 0,36) ng/ml per OPG e 15,05 (SD 35,76) pg/ml per PTH. Alla settimana 48, il 42,7% dei pazienti per osteocalcina e il 32% per crosslaps eccedevano i rispettivi *cut-offs* di normalità. Quindi rispetto all'arruolamento è stato osservato un significativo incremento della proporzione di pazienti sopra il cut-off ($p < 0,01$). RANKL è rimasto non rilevabile nell'87% dei pazienti. L'analisi della correlazione lineare tra i parametri ossei ha messo in evidenza una debole correlazione solamente tra osteocalcina e crosslaps ($r = 0,26$; $p = 0,026$).

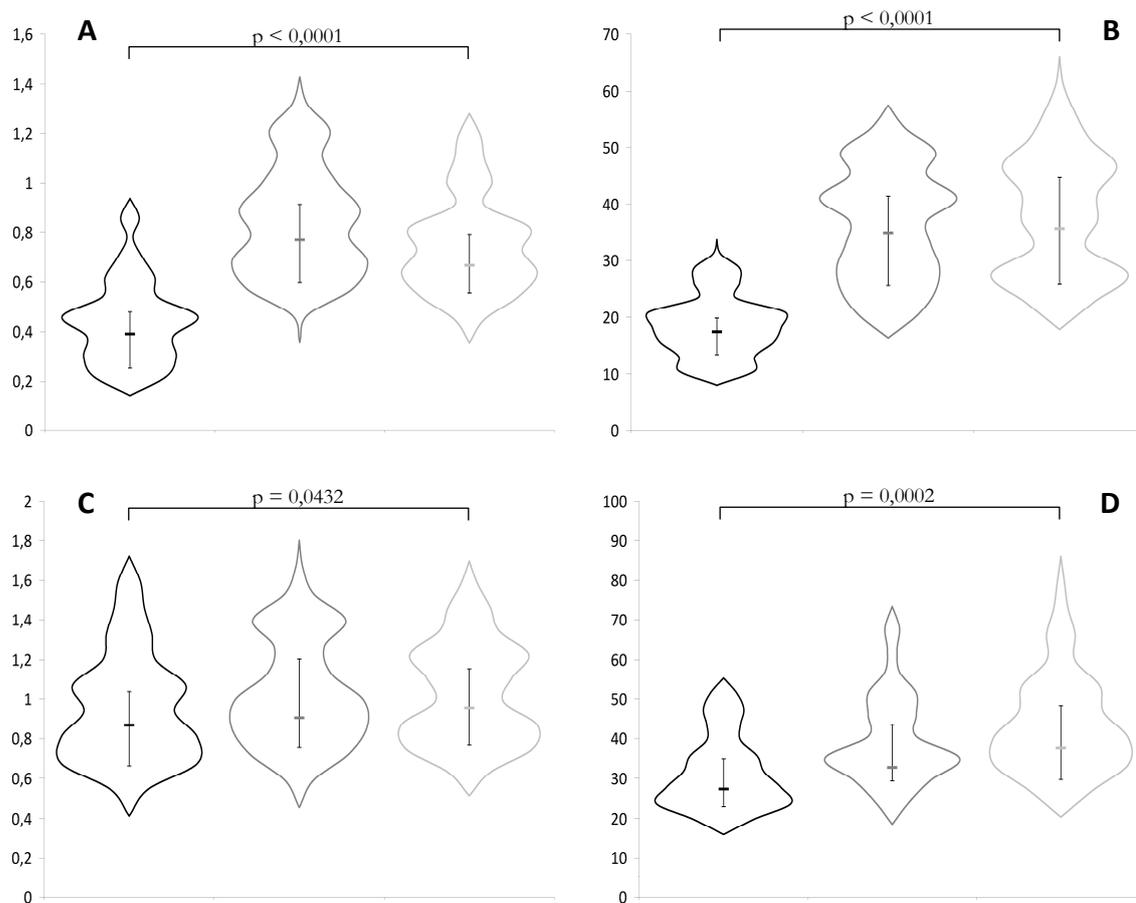


Figura 1: Violin plot del dosaggio plasmatico di crosslaps nei pazienti partecipanti allo studio. Nel grafico è indicata per ogni popolazione la mediana, con range interquartile. ■ Base line; ■ 24 settimane; ■ 48 settimane. Test statistici eseguiti con metodo Mann-Whitney. A) Crosslaps, CTx B) Osteocalcina C) Osteoprotegerina, OPG D) Ormone paratiroideo umano, hPTH.

4.2. EFFETTI DELLA TERAPIA ANTIRETROVIRALE CONVENZIONALE SULLA LINEA OSTEOBLASTICA HOBIT

Questo studio mira ad approfondire il ruolo dei farmaci antiretrovirali nelle alterazioni metaboliche a carico dell'osso. In particolare, questo studio si focalizza sugli osteoblasti, ovvero il citotipo responsabile della sintesi di nuova matrice ossea. Gli esperimenti condotti sulla linea osteoblastica umana, cellule HOBIT, puntano ad evidenziare gli effetti di diversi farmaci, singolarmente ed in combinazione, sulla vitalità cellulare e sull'espressione di diversi markers del metabolismo osseo. Parte di questi dati sono stati pubblicati (Gibellini *et al.*, 2010a), mentre altri sono in corso di pubblicazione.

4.2.1. Quantificazione dell'apoptosi a 24 e 48 ore post trattamento con PI

Nel primo gruppo di esperimenti, è stata quantificata l'apoptosi in cellule HOBIT trattate con diversi farmaci appartenenti alla classe degli inibitori della proteasi virale. Le colture cellulari sono state raccolte a 24 e 48 ore post-trattamento, fissate, marcate con propidio ioduro ed analizzate in citometria a flusso. Atazanavir, indinavir, fosamprenavir, darunavir e saquinavir non hanno mostrato livelli significativi di apoptosi a nessuna delle concentrazioni testate (**Figura 2**), mentre il tipranavir alla concentrazione C3 mostra un incremento nei livelli di apoptosi sia a 24 sia a 48 ore ($7\% \pm 1,5$ vs $2,9\% \pm 1,2$ a 24 ore e $10,9\% \pm 4$ vs $4,1\% \pm 2,3$ a 48 ore).

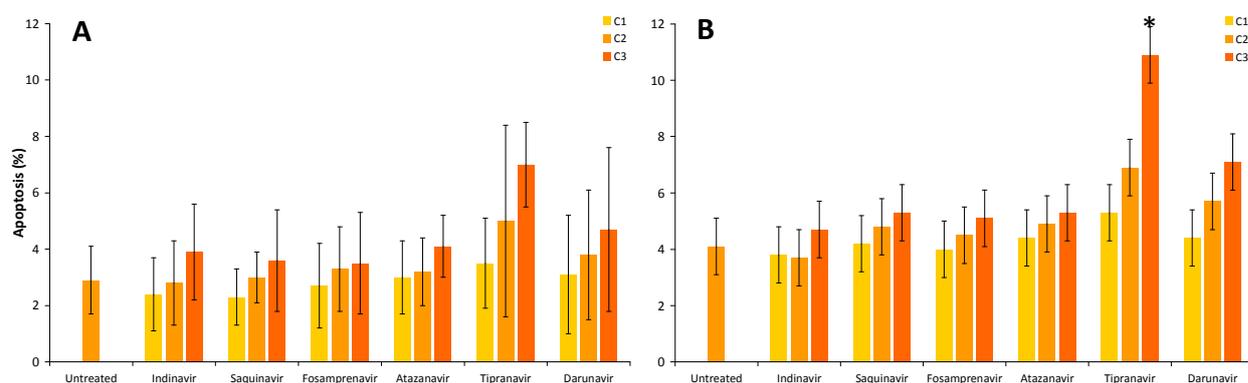


Figura 2: Grafico a barre dei livelli di apoptosi nelle colture di cellule HOBIT in presenza delle tre diverse concentrazioni di farmaco. I dati riportati nel grafico rappresentano la percentuale di cellule apoptotiche, espresso come media (%) \pm SD di tre esperimenti eseguiti in duplicato. A) apoptosi a 24 ore post-trattamento, B) apoptosi a 48 ore post-trattamento. * $p < 0,05$ test di Mann-Whitney.

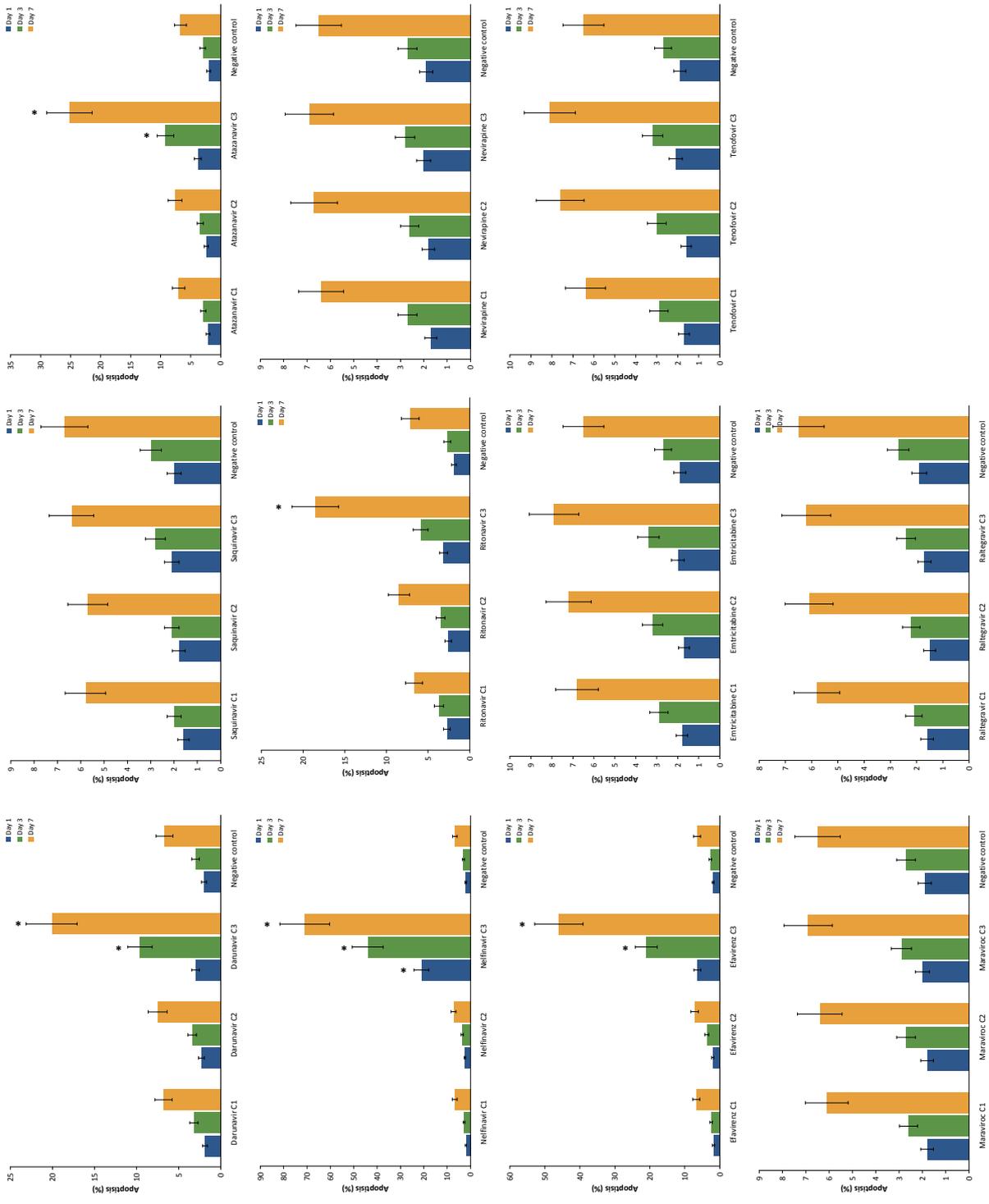


Figura 3: Grafico a barre dei livelli di apoptosi nelle colture di cellule HOBIT in presenza delle tre diverse concentrazioni di farmaco a tre tempi differenti: 1, 3 e 7 giorni. I dati riportati nel grafico rappresentano la percentuale di cellule apoptotiche, espresso come media (%) \pm SD di tre esperimenti eseguiti in duplicato. Ogni pannello rappresenta un farmaco diverso. * $p < 0,05$ test di Mann-Whitney.

4.2.2. Quantificazione dell'apoptosi a 1, 3 e 7 giorni post-trattamento con farmaci in singolo ed in combinazione

In un nuovo set di esperimenti, è stata quantificata l'apoptosi in cellule HOBIT trattate con diversi farmaci antiretrovirali appartenenti a diverse classi. Diversamente dall'esperimento precedente, le colture cellulari sono state ugualmente trattate con tre diverse concentrazioni di farmaci, ma raccolte a 1, 3 e 7 giorni post-trattamento, fissate, marcate con propidio ioduro ed analizzate in citometria a flusso. Saquinavir, nevirapina, emtricitabina, tenofovir, maraviroc e raltegravir non hanno mostrato alterazioni significative nei livelli di apoptosi a nessuna delle concentrazioni testate (**Figura 3**), mantenendosi in linea con il controllo non trattato anche a 7 giorni post trattamento. Darunavir, atazanavir, nelfinavir ed efavirenz, invece, hanno evidenziato livelli di apoptosi significativamente diversi rispetto al controllo non trattato nel caso della concentrazione C3, in taluni casi (nelfinavir ed efavirenz) già a 24 ore dal trattamento. In particolare, alla concentrazione C3, a 7 giorni dal primo contatto col farmaco, i livelli di apoptosi erano: darunavir $20,1\% \pm 3,0$, atazanavir $25,2\% \pm 3,8$, nelfinavir $71\% \pm 10,7$ e efavirenz $46\% \pm 6,9$ vs $6,7\% \pm 1,1$ del controllo non trattato.

Successivamente, i farmaci inibitori della proteasi virale (classe PI) sono stati testati sulle cellule HOBIT in combinazione con il farmaco "booster" ritonavir, come previsto dalla pratica clinica. Come mostrato in **Figura 3**, il ritonavir induce significativamente apoptosi nelle cellule HOBIT a C3 al giorno 7 post-trattamento ($18,6\% \pm 2,8$ vs $7,2\% \pm 1,1$ del controllo). Pertanto, abbiamo voluto verificare l'effetto della combinazione tra PI e booster di ritonavir sulle colture cellulari. Anche in questo caso le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di farmaci, accoppiando $C1_{PI}/C1_{RTV}$, $C2_{PI}/C2_{RTV}$ e $C3_{PI}/C3_{RTV}$, raccolte a 1, 3 e 7 giorni post-trattamento, fissate e marcate con propidio ioduro ed analizzate in citometria a flusso. Diversamente da quanto osservato in precedenza (**Figura 3**), questi esperimenti hanno messo in luce significativi livelli di apoptosi indotti dal saquinavir in presenza di ritonavir alla C3 (**Figura 4**), mentre gli altri PI hanno evidenziato un significativo incremento nei livelli di apoptosi alla C3 in presenza di ritonavir se paragonati ai sin-

goli farmaci (**Figura 3**), nel caso del nelfinavir in presenza di ritonavir (**Figura 4D**) già 24 ore post-trattamento.

Infine, i farmaci sono stati testati sulle cellule HOBIT nella formulazione in uso nella pratica clinica, ovvero con un backbone nucleotidico costituito da tenofovir ed emtricitabina, in associazione ad un terzo farmaco, costituito un farmaco della classe PI boosterato con ritonavir (SQV, DRV, NFV e ATV), oppure della classe degli inibitori dell'entrata del virus nella cellula bersaglio (MVC), o inibitori dell'integrasi virale (RAL), o un farmaco della classe NNRTI (EFV, NEV). Il test con i farmaci in combinazione, tutti testati a C2, non ha messo in evidenza differenze significative nei valori di apoptosi rispetto al controllo (**Figura 5**). Solamente la combinazione FTC+TEN+NFV/r ha mostrato un minimo incremento nell'apoptosi, ma non statisticamente significativo, a 7 giorni post-trattamento (**Figura 5A**).

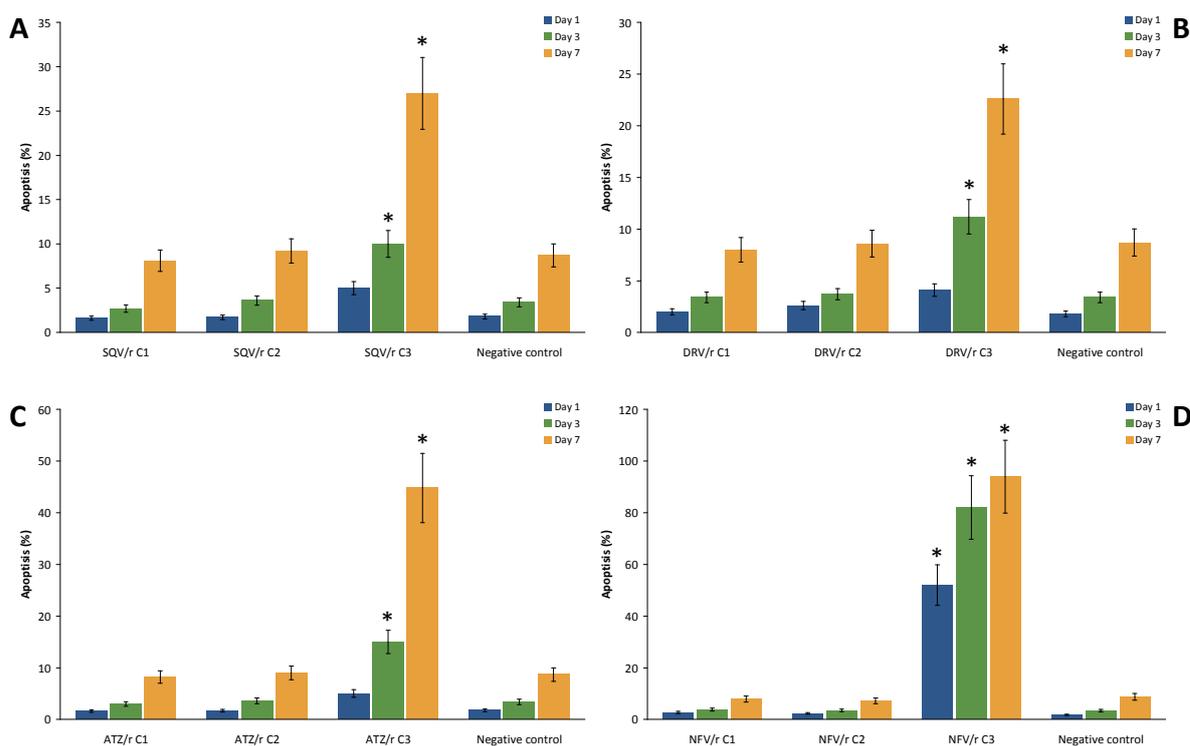


Figura 4: Grafico a barre dei livelli di apoptosi nelle colture di cellule HOBIT in presenza delle tre diverse concentrazioni di farmaci della classe PI, in combinazione con ritonavir, a tre tempi differenti: 1, 3 e 7 giorni. I dati riportati nel grafico rappresentano la percentuale di cellule apoptotiche, espresso come media (%) \pm SD di tre esperimenti eseguiti in duplicato. Ogni pannello rappresenta un farmaco diverso. * $p < 0,05$ test di Mann-Whitney.

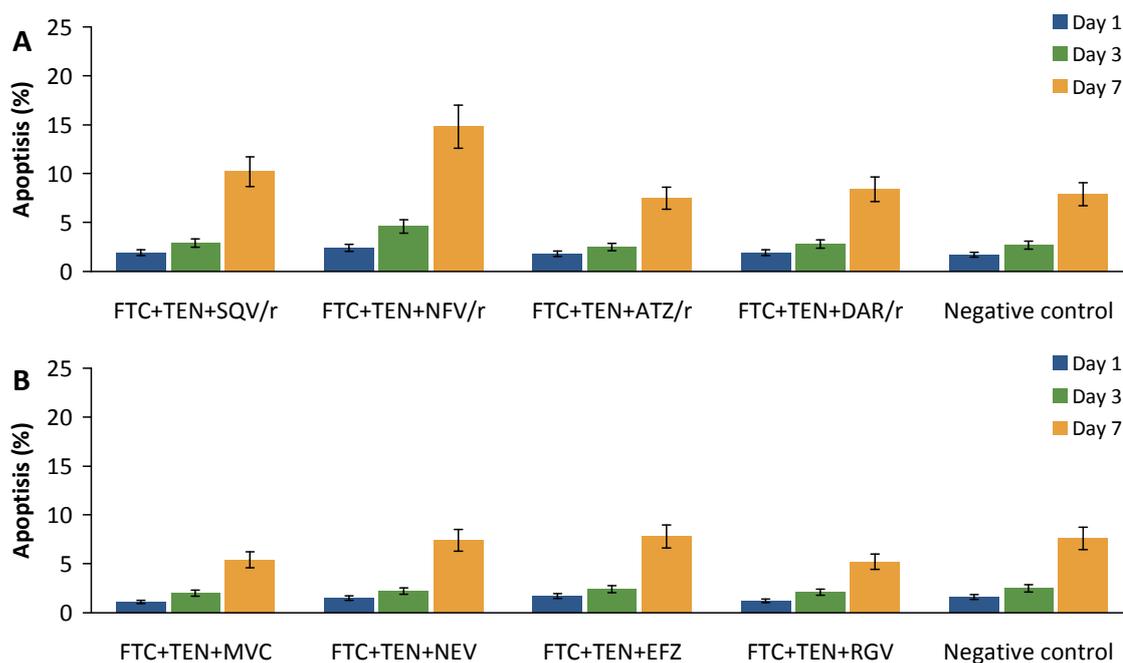


Figura 5: Grafico a barre dei livelli di apoptosi nelle colture di cellule HOBIT in presenza di farmaci del backbone (FTC+TEN), associato a diversi farmaci: A) classe PI, B) diverse classi. Tutti i farmaci sono stati testati alla C2, e l'apoptosi è stata valutata a tre tempi differenti: 1, 3 e 7 giorni. I dati riportati nel grafico rappresentano la percentuale di cellule apoptotiche, espresso come media (%) \pm SD di tre esperimenti eseguiti in duplicato.

4.2.3. Dosaggio di OPG, RANKL e rapporto OPG/RANKL a 24 e 48 ore post trattamento con PI

Nella prima serie di esperimenti sono stati dosati i livelli nel surnatante di coltura di RANKL e OPG, a 24 e 48 ore post-trattamento. I livelli di OPG non sono mai risultati significativamente alterati in presenza di indinavir, atazanavir, darunavir o saquinavir a tutte le concentrazioni testate e tempi testati (**Figura 6**). Tuttavia il fosamprenavir induce un incremento nei livelli di OPG a C2 e C3 già a 24 ore dal trattamento (**Figura 6A-B**): a 24 ore dal trattamento con C2 i livelli registrati erano $3530\text{pg/ml} \pm 847$ vs $1858\text{pg/ml} \pm 241$ del controllo ($p < 0,05$), mentre a 48 ore dal trattamento $2731\text{pg/ml} \pm 519$ vs $1760\text{pg/ml} \pm 334$ del controllo ($p < 0,05$). Tra i composti testati il tipranavir è stato l'unico a indurre un decremento di OPG, a 24 e 48 ore post-trattamento, sia a C2 sia a C3 ($p < 0,05$, **Figura 6A-B**). La quantificazione di

RANKL nei surnatanti di coltura (**Figura 6C-D**) ha messo in evidenza come, analogamente ad OPG, fosamprenavir e tipranavir inducano alterazioni in RANKL, così come darunavir, mentre saquinavir, atazanavir e indinavir non evidenziano significative alterazioni in nessuna delle condizioni sperimentali testate. In particolare, fosamprenavir riduce i livelli di RANKL solamente in presenza di C2 a 24 ore ($162\text{pg/ml}\pm 24$ vs $267\text{pg/ml}\pm 59$ del controllo, $p<0,05$) e a 48 ore dal trattamento ($164\text{pg/ml}\pm 21$ vs $274\text{pg/ml}\pm 44$ del controllo, $p<0,05$), mentre a C3 il decremento di RANKL dovuto al fosamprenavir era rilevabile, ma non statisticamente significativo. Tipranavir riduce RANKL sia alla concentrazione C2 sia a C3, a 24 ore (C2: $141\text{pg/ml}\pm 11$ vs 267 ± 59 del controllo, $p<0,05$; C3: $88\text{pg/ml}\pm 10$ vs $267\text{pg/ml}\pm 59$ del controllo, $p<0,05$) e a 48 ore (C2: $151\text{pg/ml}\pm 15$ vs $274\text{pg/ml}\pm 44$ del controllo, $p<0,05$; C3: $85\text{pg/ml}\pm 11$ vs $274\text{pg/ml}\pm 44$ del controllo, $p<0,05$). Diversamente da fosamprenavir e tipranavir, darunavir induce un incremento nei livelli di RANKL nel surnatante di coltura, anche se solo in modo transitorio, ovvero solamente alla concentrazione C3 a 24 ore post-trattamento ($412\text{pg/ml}\pm 83$ vs $267\text{pg/ml}\pm 59$ del controllo, $p<0,05$).

Il rapporto OPG/RANKL può essere considerato un buon parametro per monitorare l'omeostasi ossea. Bassi livelli plasmatici del rapporto OPG/RANKL sono stati messi in relazione con una bassa massa ossea in alcuni pazienti HIV-positivi naïve (Gibellini *et al.*, 2007). Il rapporto OPG/RANKL, calcolato dalle medie di OPG e RANKL, ha messo in evidenza una netta alterazione rispetto al controllo solamente in presenza di fosamprenavir (**Figura 7**). L'inibitore della proteasi fosamprenavir ha mostrato un rapporto pari 21,8 a C2, nettamente maggiore del 6,9 del controllo a 24 ore post-trattamento, alterazione che persiste anche a 48 ore con un rapporto di 17,7 contro il 6,4 del controllo. Questo è dovuto al concomitante incremento di OPG e decremento di RANKL in presenza di fosamprenavir. Inoltre, tipranavir ha evidenziato un debole incremento nel rapporto (**Figura 7**), sebbene sia OPG sia RANKL siano scesi rispetto al controllo (**Figura 6**), mentre atazanavir e darunavir inducono una debole riduzione del rapporto, in precise condizioni sperimentali (atazanavir C3 a 24 ore 4,3 vs 6,9 del controllo e darunavir C3 a 24 ore 4,9 vs 6,9).

Il dosaggio di queste citochine nella seconda serie di esperimenti, con i farmaci testati in diverse combinazioni, è tuttora in corso.

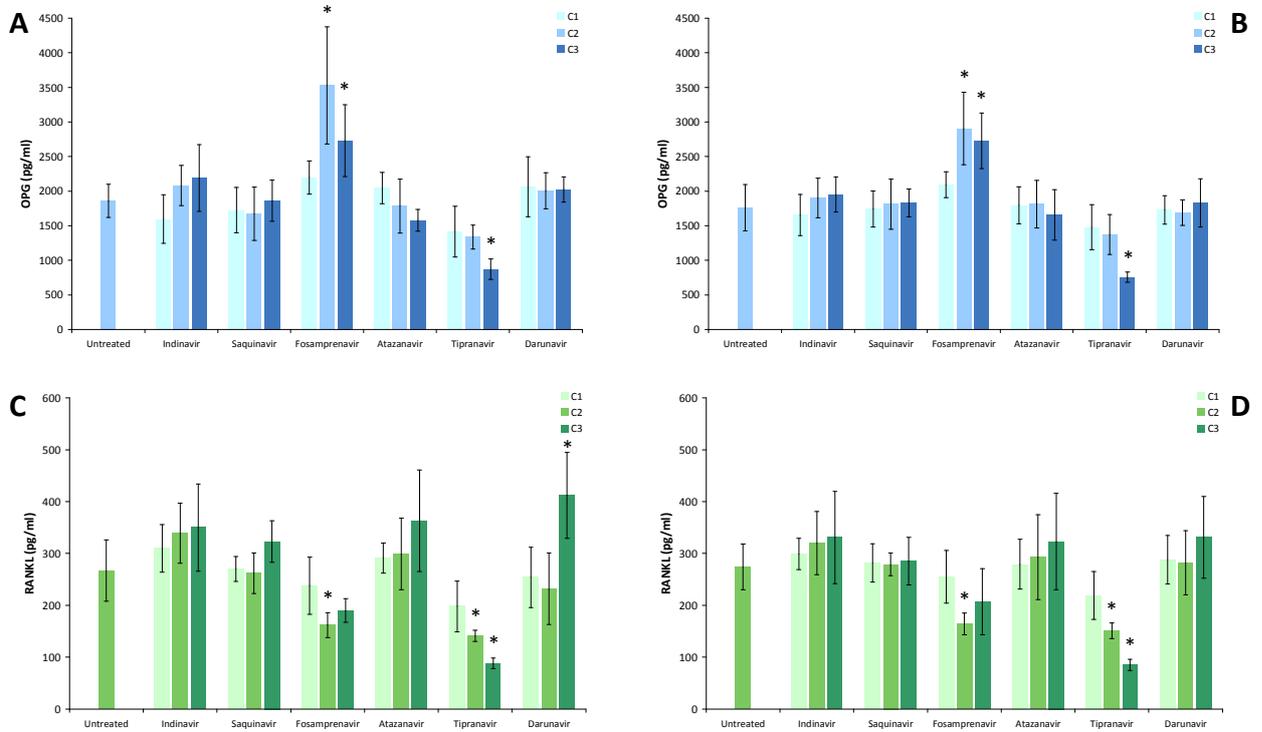


Figura 6: Dosaggio di OPG e RANKL nel surnatante di coltura a diversi tempi e concentrazioni. A) OPG a 24 ore, B) OPG a 48 ore, C) RANKL a 24 ore, D) RANKL a 48 ore. * $p < 0,05$ test di Mann-Whitney.

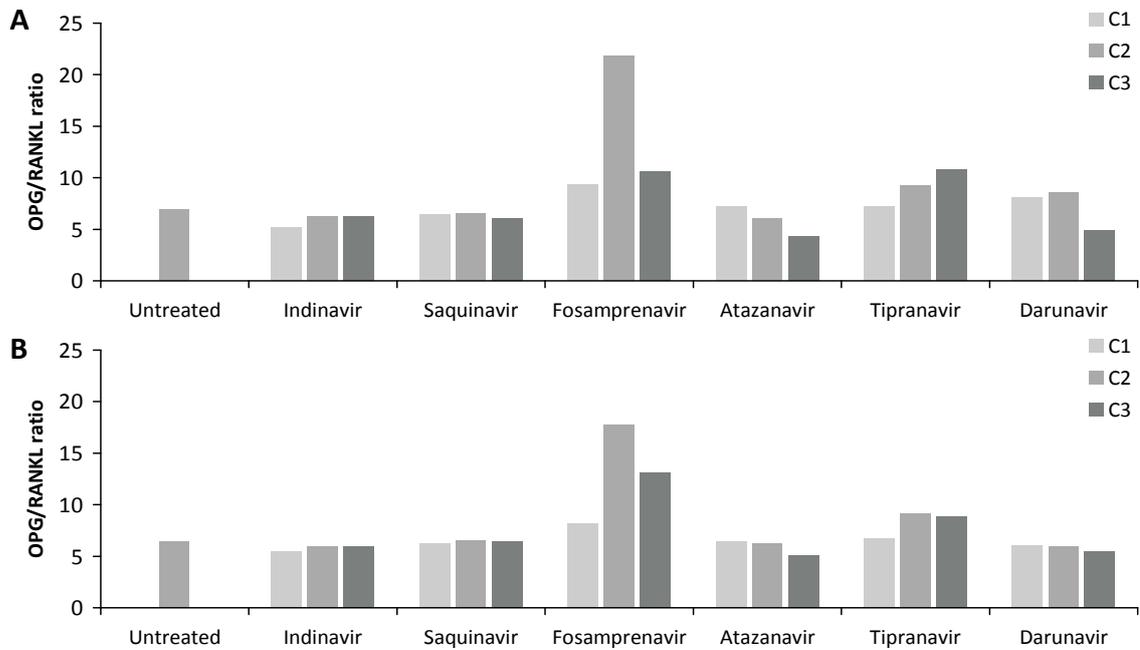


Figura 7: Rapporto tra OPG e RANKL a diversi tempi e concentrazioni. A) OPG/RANKL a 24 ore, B) OPG/RANKL a 48 ore.

4.2.4. Quantificazione dell'mRNA di diversi markers ossei a 1, 3 e 7 giorni post-trattamento con combinazioni di farmaci

Le combinazioni di farmaci che ritroviamo impiegate nella pratica clinica (Antinori *et al.*, 2012) sono state testate su colture di cellule HOBIT' alla concentrazione C2, ovvero la concentrazione plasmatica media rilevata nei pazienti in trattamento (Datapharm Communications Ltd. The Medicines Compendium, 2008). Le colture cellulari sono state raccolte a 1, 3 e 7 giorni post-trattamento ed è stata analizzata l'espressione di diversi markers del metabolismo osseo: fosfatasi alcalina (AP), attiva nella formazione di nuovo osso (Kim *et al.*, 2013), osteocalcina (OC), anch'essa coinvolta nella formazione di nuova matrice ossea (Neve *et al.*, 2013), RUNX-2, fondamentale nel differenziamento e maturazione degli osteoblasti (Khalid *et al.*, 2008), *parathyroid hormone 1 receptor* (PTH1R), coinvolto nell'omeostasi dello ione calcio e nell'attivazione degli osteoclasti mediante induzione di RANKL (Datta *et al.*, 2010).

L'analisi della **Figura 8** evidenzia come le combinazioni terapeutiche, basate sui farmaci inibitori della proteasi, inducano una generale regolazione negativa di diversi markers già a tre giorni post-trattamento, mentre invece le combinazioni terapeutiche basate su altre classi di farmaci sembrano non indurre alterazioni significative, o addirittura, nel caso della combinazione di tenofovir+emtricitabina e raltegravir (FTC+TEN+RAL), i farmaci sembrano avere un'azione protettiva sui markers ossei. Sebbene si tratti di regolazioni negative di moderata entità, è necessario tenere presente che l'analisi è stata effettuata con la sola C2, e che le alterazioni sono evidenti già nei primi giorni dal trattamento.

L'analisi del profilo di espressione dei markers ossei nelle combinazioni terapeutiche che prevedono l'utilizzo di altri farmaci della classe PI è tutt'ora in corso.

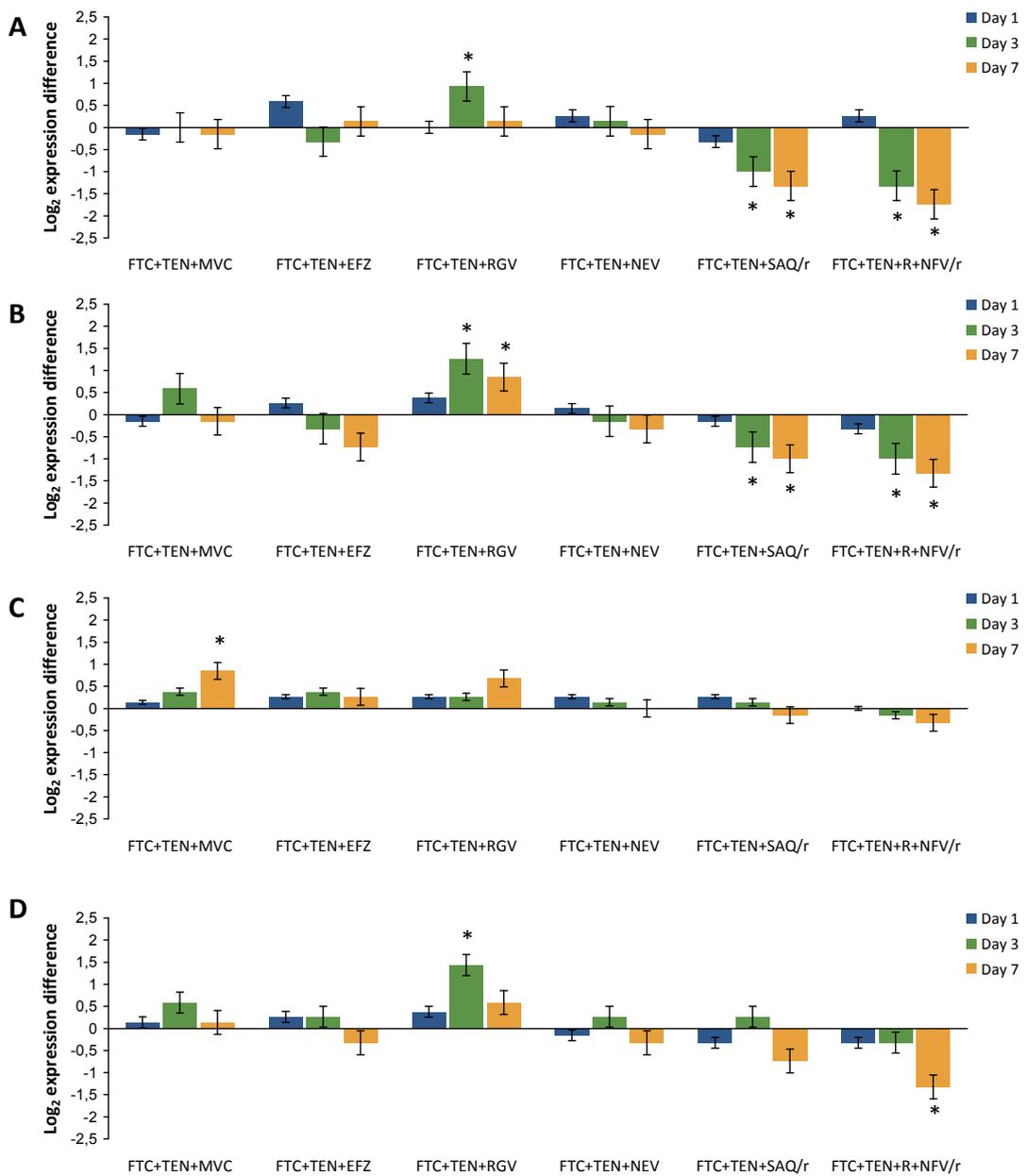


Figura 8: Quantificazione di quattro diversi markers di attività e differenziamento osteoblastico mediante qRT-PCR, espresso come differenze in Log_2 rispetto al controllo di cellule HOBIT non trattate. A) Fosfatasi alcalina, B) Osteocalcina, C) RUNX-2, D) PTHR1. * $p < 0,05$ test di Mann-Whitney.

4.3. COSTRUZIONE DI PROTEINE CHIMERICHE INTEGRASI/FOKI IN GRADO DI REVERTIRE L'INTEGRAZIONE VIRALE

4.3.1. Clonazione e mutagenesi delle proteine chimeriche integrasi/FokI in vettori di espressione

Il gene codificante per la proteina integrasi è stato isolato da un preparato clinico HIV-1 positivo, appartenente al clade B. In un primo momento clonato nel vettore pCR8, è stato successivamente clonato nel vettore d'espressione eucariotica pcDNA3.1D, aggiungendo all'estremità 5' della sequenza clonata la tripletta ATG, mancante nel genoma di HIV, in quanto integrasi fa parte di una poliproteina Gag-Pol. Il gene codificante per l'intera endonucleasi FokI è stato isolato da un estratto di DNA genomico del batterio *F. okeanokoites*, quindi clonato nel vettore pGEM-T easy. Successivamente, la sequenza nucleotidica codificante il dominio C-terminale dell'enzima di restrizione, contenente il sito catalitico dell'enzima, è stata clonata nel vettore d'espressione eucariotica pcDNA3.1D, aggiungendo all'estremità 5' della sequenza clonata la tripletta ATG. Al 5' della sequenza codificante per il dominio catalitico di FokI si trova una sequenza *linker* (aa 373-387, GenBank: AAA24934.1), che in natura lega i domini NTD e CTD di FokI (Wah *et al.*, 1997, 1998).

Per ottenere la fusione dei due geni, integrasi all'estremità 5' e FokI-CTD al 3', le due sequenze geniche sono state nuovamente amplificate, aggiungendo in coda ad integrasi ed in testa a FokI-CTD la sequenza nucleotidica riconosciuta dall'enzima di restrizione BamHI. I due amplificati sono stati digeriti con BamHI e, mediante la ligasi T4, le due estremità *sticky* omologhe sono state ligate. Il costrutto così ottenuto è stato clonato nel vettore pGEM-T easy.

Tuttavia, dopo trasformazione e selezione su piastra Petri, le pochissime colonie batteriche ottenute mostravano una sequenza nucleotidica del gene clonato con almeno una delezione puntiforme, con conseguente alterazione nella traduzione e sintesi proteica. Questo ad indicare che la proteina chimerica sintetizzata era altamente tossica per i batteri, seppure il medesimo ceppo batterico tollerasse la trasformazione sia con l'integrasi, sia con FokI-CTD. La conferma di questa ipotesi è arrivata

tentando di revertire la delezione mediante mutagenesi sito-specifica. Dopo i cicli di mutagenesi, infatti, non è stato possibile osservare alcuna colonia su piastra Petri.

Per annullare l'effetto letale della chimera nelle cellule batteriche sono state introdotte due mutazioni sito-specifiche sul dominio C-terminale dell'integrasi (R262A e R263A), con lo scopo di ridurre l'affinità aspecifica per il DNA di questa proteina (Semenova *et al.*, 2008). Revertendo la delezione dopo aver mutagenizzato i due residui di arginine è stato possibile ottenere un clone dalla sequenza integra (pChim2M). Da questa base abbiamo ottenuto un clone chimerico con cinque mutazioni sito-specifiche sul C-terminale dell'integrasi (K258A, R262A, R263A, K264A e K266A, pChim5M) allo scopo di indebolire sempre più il riconoscimento aspecifico del DNA da parte dell'integrasi di HIV-1 (Ceccherini-Silberstein *et al.*, 2009). Infine abbiamo generato 2 cloni chimerici con delezioni su integrasi, delezione dell'intero dominio C-terminale (pChim11.3) e delezione di due domini, CCD e CTD (pChim10.1) (Delelis *et al.*, 2008; Eijkelenboom *et al.*, 1999; Yi *et al.*, 2000), ottenendo, inoltre, i cloni di controllo in vettore di espressione pcDNA3.1D anche delle singole integrasi con delezioni.

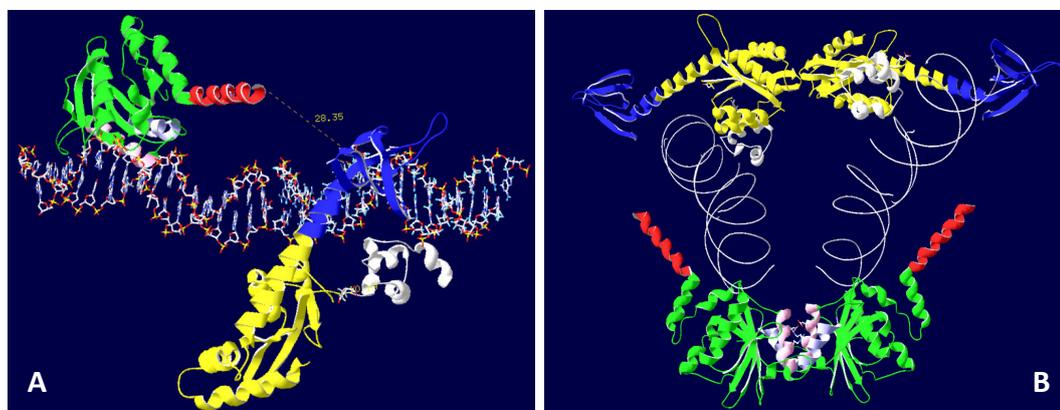


Figura 9: Simulazione con software DeepView/Swiss-PdbViewer (versione 4.0.1, Swiss Institute of Bioinformatics, CH) del costrutto chimerico integrasi-FokI. A) Monomero su filamento di DNA del genoma virale integrato, B) Dimerico del costrutto chimerico su due diverse molecole di DNA. Schema di colori: bianco, dominio N-terminale (NTD) di integrasi; giallo, dominio centrale (CCD) di integrasi; blu, porzione del dominio C-terminale (CTD) di integrasi; rosso, linker *wild-type* di FokI con struttura ad α -elica; verde, dominio catalitico di FokI; rosa, α -eliche parallele $\alpha 4$ e $\alpha 5$ del dominio endonucleasico di FokI che mediano la dimerizzazione dell'enzima di restrizione, evidenziati i residui coinvolti nella possibile formazione di un ponte salino. PBD files: 1EX4, 1WJA, 1FOK, 1TQR.

4.3.2. Transfezione stabile ed espressione dei cloni chimerici in cellule T linfoblastoidi Jurkat

Le cellule della linea cellulare Jurkat sono state transfettate separatamente con i seguenti cloni: plasmide di espressione vuoto di controllo (pcDNA3.1Dempty), integrasi di HIV-1 (pIntW^TI), clone chimerico con due mutazioni puntiformi sul CTD di integrasi (pChim2M), clone chimerico con cinque mutazioni puntiformi sul CTD di integrasi (pChim5M), clone chimerico con delezione del CTD di integrasi (pChim11.3), clone chimerico con delezione del CCD e del CTD di integrasi (pChim10.1). Per fare questo è stato utilizzato il sistema Nucleofector Amaxa (Lonza), utilizzando kit e programma di transfezione specificatamente studiati per le cellule Jurkat. La nucleofezione ha raggiunto mediamente il 70% di efficienza, verificato con transfezioni di controllo con il plasmide di controllo pmaxGFP verificate in citometria a flusso. La selezione di cloni cellulari stabilmente transfettati è stata ottenuta mediante trattamento con l'antibiotico di selezione G418 alla concentrazione di 0,5mg/ml e mantenuto sempre in aggiunta al medium di coltura. Venti giorni dopo la transfezione la proliferazione cellulare, verificata tramite conta vitale con Trypan Blue, si è stabilizzata, con un tempo di duplicazione identico alle cellule Jurkat non transfettate di controllo. L'analisi del ciclo cellulare al citometro a flusso, dopo trenta giorni di selezione e la generazione di cloni transfettati stabilmente, non ha evidenziato alcuna differenza nelle diverse fasi rispetto al controllo non transfettato (dati non mostrati). L'avvenuta transfezione è stata osservata con diverse metodiche: in citometria a flusso (**Figura 10A**), in immunofluorescenza (**Figura 10B**) evidenziando una colocalizzazione nucleare e citoplasmatica della proteina ricombinante. Inoltre, tramite PCR classica (**Figura 10C**) e qRT-PCR (**Figura 10D**) abbiamo potuto verificare l'effettiva presenza dei costrutti plasmidici e l'effettiva trascrizione dei geni chimerici, a livelli paragonabili tra le diverse linee cellulari transfettate.

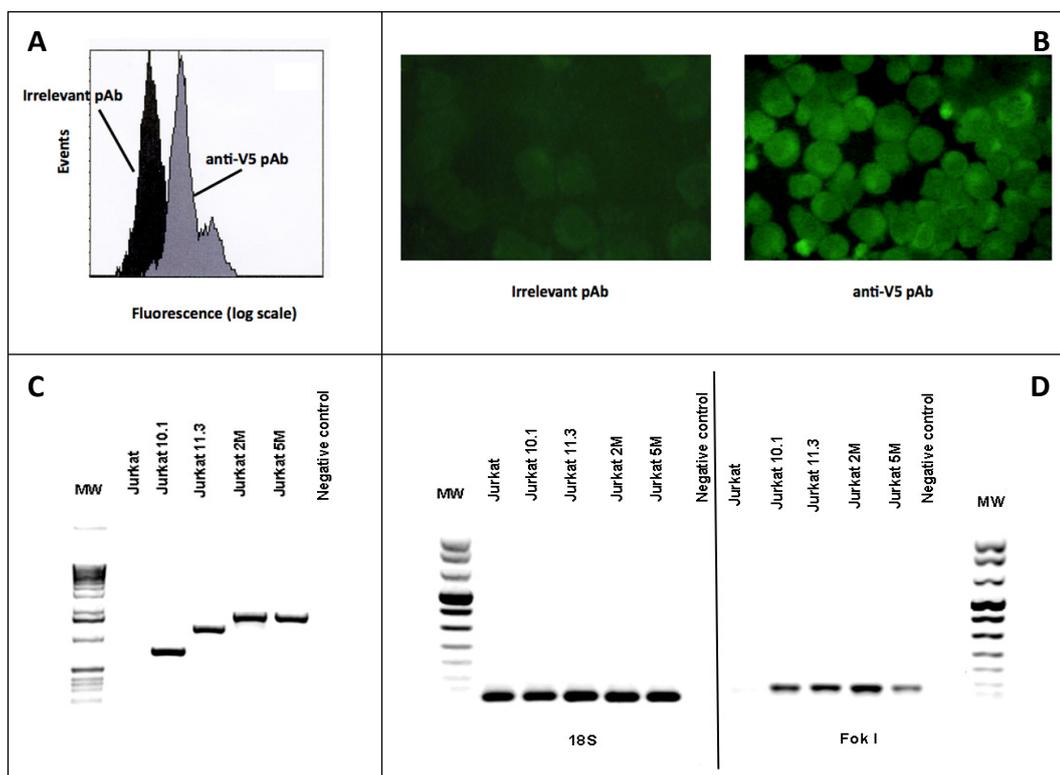


Figura 10: Caratterizzazione delle cellule Jurkat dopo transfezione e selezione. A) Analisi in citometria a flusso con anticorpo anti-V5-FITC della linea Jurkat-pChim2M. B) Immunofluorescenza su citospin anticorpo anti-V5-FITC di Jurkat-pChim2M. C) Gel di agarosio (1%) della PCR classica su estratto di DNA dalle linee Jurkat transfettate: lane 1, 1Kb DNA Extension Ladder (Life Technologies); lane 2, cellule Jurkat non transfettate; lane 3: cellule Jurkat-pChim10.1; lane 4: cellule Jurkat-pChim11.3; lane 5: cellule Jurkat-pChim2M; lane 6: cellule Jurkat-pChim5M; lane 7: controllo negativo della PCR. D) Gel di agarosio (2%) della qRT-PCR su estratto di RNA dalle linee Jurkat transfettate: lane 1 e 14, Marker VIII (Roche, Mannheim, Germany); lane 2-7: amplificazione del gene housekeeping 18S su estratti di cellule Jurkat non transfettate, Jurkat-pChim10.1, Jurkat-pChim11.3, Jurkat-pChim2M, Jurkat-pChim5M e controllo negativo della PCR; lane 8-13: amplificazione della porzione C-terminale delle chimere (FokI-CTD) su estratti di cellule Jurkat non transfettate, Jurkat-pChim10.1, Jurkat-pChim11.3, Jurkat-pChim2M, Jurkat-pChim5M e controllo negativo della PCR.

4.3.3. Specifici cloni transfettati in cellule Jurkat contrastano l'infezione da HIV-1

In un primo set di esperimenti, per valutare se le linee cellulari transfettate stabilmente fosse in grado di resistere e contrastare l'infezione da HIV-1, abbiamo infettato queste linee cellulari con il ceppo di laboratorio linfotropico HIV-1_{IIIb}. In un

primo esperimento di infezione a 5ng/ml di p24 (~10 m.o.i.), il surnatante delle colture è stato raccolto ed analizzato a 72 ore post-infezione, dosando il livelli dell'antigene virale p24. Il risultato dell'analisi ha evidenziato come i cloni pChim2M e pChim11.3, nelle condizioni sperimentali testate, siano in grado di contrastare il virus, riducendone i livelli del 50% rispetto alla linea di controllo transfettata con pcDNA3.1Dempty ($p < 0,05$ test T di Student). Le altre linee cellulari transfettate, invece, non hanno mostrato differenze significative rispetto al controllo, mostrando una debole flessione nei livelli di infezione solamente nelle linee Jurkat-pChim10.1 e Jurkat-pIntWT, seppure non statisticamente significativa (**Figura 11**).

In un secondo esperimento, la linea cellulare Jurkat transfettata con pChim2M, il clone con integrasi più simile al wt, è stata nuovamente infettata con ceppo di laboratorio HIV-1_{IIIb}, ma con una quantità di virus 25 volte inferiore (~0,4 m.o.i.) e monitorata nel tempo assieme alla linea di controllo pcDNA3.1Dempty e i rispettivi controlli non infettati. L'analisi dei livelli di p24 secreta ha rivelato come questo clone sia in grado, nelle condizioni sperimentali testate, di controllare l'infezione, riducendo il livello di p24 del 70% rispetto alla linea di controllo infettata, anche a 216 ore dall'infezione ($p < 0,01$) (**Figura 12**).

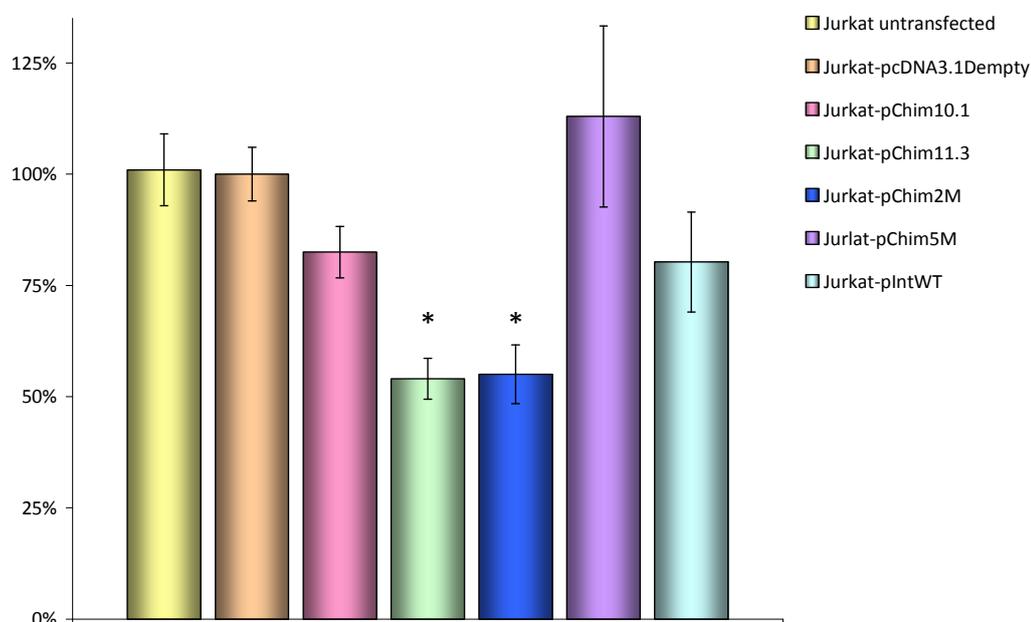


Figura 11: Dosaggio della proteina virale p24 nel surnatante di coltura a 72 ore post-infezione. Le barre rappresentano il valore medio di tre esperimenti in duplicato, barra d'errore è la SD, rispetto al controllo Jurkat-pcDNA3.1Dempty. * $p < 0,05$ test T di Student.

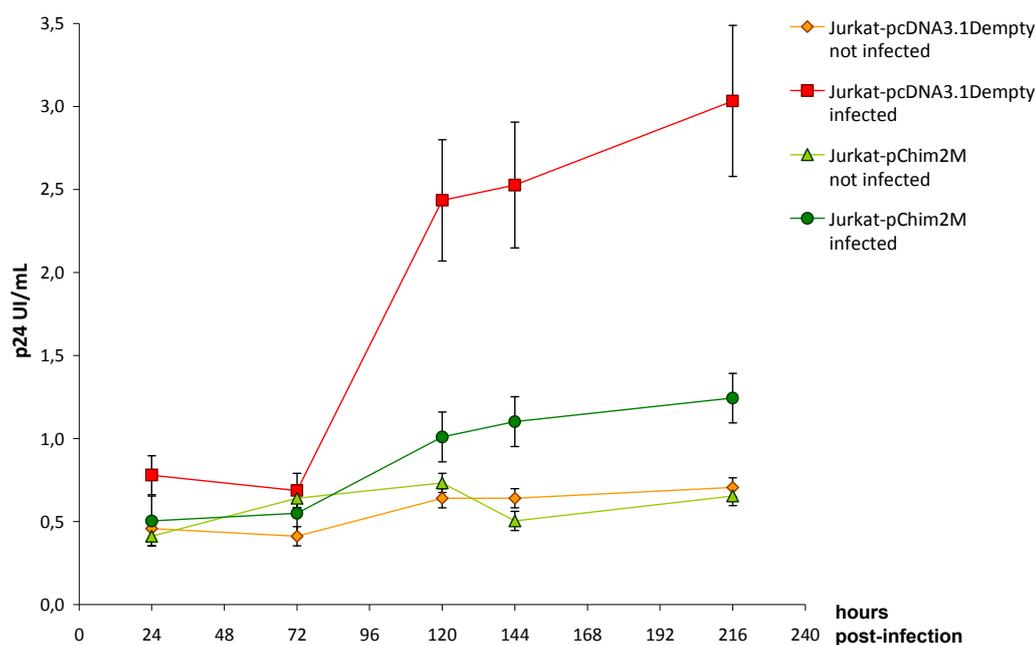


Figura 12: Dosaggio della proteina virale p24 nel surnatante di coltura fino a 216 ore post-infezione. Le linee rappresentano le diverse linee cellulari infettate e monitorate nell'esperimento. I punti rappresentano la media, barra d'errore è la SD, di tre esperimenti in duplicato.

4.3.4. Transfezione stabile ed espressione dei cloni chimerici in cellule T linfoblastoidi 8E5LAV, contenenti una singola copia integrata di HIV-1

Le cellule della linea cellulare 8E5LAV sono state transfettate separatamente con i seguenti cloni: plasmide di espressione vuoto di controllo (pcDNA3.1Dempty), integrasi di HIV-1 (pIntWT), clone chimerico con due mutazioni puntiformi sul CTD di integrasi (pChim2M), clone chimerico con cinque mutazioni puntiformi sul CTD di integrasi (pChim5M), clone chimerico con delezione del CTD di integrasi (pChim11.3), clone chimerico con delezione del CCD e del CTD di integrasi (pChim10.1). Per fare questo è stato utilizzato il sistema Nucleofector Amaxa (Lonza), utilizzando kit e programma di transfezione specificatamente studiati per le cellule T CD4⁺ attivate. La nucleofezione ha raggiunto mediamente il 70% di efficienza, verificato con transfezioni di controllo con il plasmide di controllo pmaxGFP verificate in citometria a flusso.

La selezione di cloni cellulari stabilmente transfettati è stata ottenuta mediante trattamento con l'antibiotico di selezione G418 alla concentrazione di 0,5mg/ml e mantenuto sempre in aggiunta al medium di coltura. Trenta giorni dopo la transfezione la proliferazione cellulare, verificata tramite conta vitale con Trypan Blue, si è stabilizzata, con un tempo di duplicazione identico alle cellule 8E5LAV non transfettate di controllo. L'analisi del ciclo cellulare al citometro a flusso, dopo trenta giorni di selezione e la generazione di cloni transfettati stabilmente, non ha evidenziato alcuna differenza nelle diverse fasi rispetto al controllo non transfettato (dati non mostrati).

4.3.5. pChim2M, pChim5M e pChim11.3 transfettati stabilmente in cellule 8E5LAV riducono sensibilmente i livelli di DNA provirale, RNA virale e proteina p24

Passati trenta giorni dalla transfezione e selezione delle cellule 8E5LAV, è stato quantificato il DNA provirale nelle cellule 8E5LAV, transfettate e di controllo, con metodica qPCR. La regione riconosciuta e amplificata dai primers ricadeva nella regione del gene Gag e, una volta normalizzati i dati rispetto al gene umano HLA, presente anch'esso in singola copia, è emerso un dato estremamente interessante. Ben tre cloni (pChim2M, pChim5M e pChim11.3) mostravano una riduzione nei livelli di DNA provirale, all'incirca di 10000 volte (**Figura 12A**). Inoltre, verificando la trascrizione di RNA virale (**Figura 12B**) e quantificando la proteina virale p24 (**Figura 12C**), abbiamo avuto la conferma che questi tre cloni, in particolare, riescono ad espletare un effetto negativo sul provirus integrato nelle cellule 8E5LAV, nelle nostre condizioni sperimentali, rispettivamente riducendo di 100000 volte l'RNA virale intracellulare e riducendo a livello del controllo negativo (Jurkat non infette) la quantificazione dell'antigene p24. Il clone pChim10.1 mostra, invece, un'attività inferiore ai tre cloni prima citati, sia a livello di DNA, sia di RNA, sia di proteina p24. È interessante notare come anche la singola integrasi *wild type* (pIntWT) abbia una significativa attività di disintegrazione nel nostro modello sperimentale, in accordo con precedenti osservazioni *in vitro* e *ex vivo* (Chow *et al.*, 1992; van Griensven *et al.*, 2004).

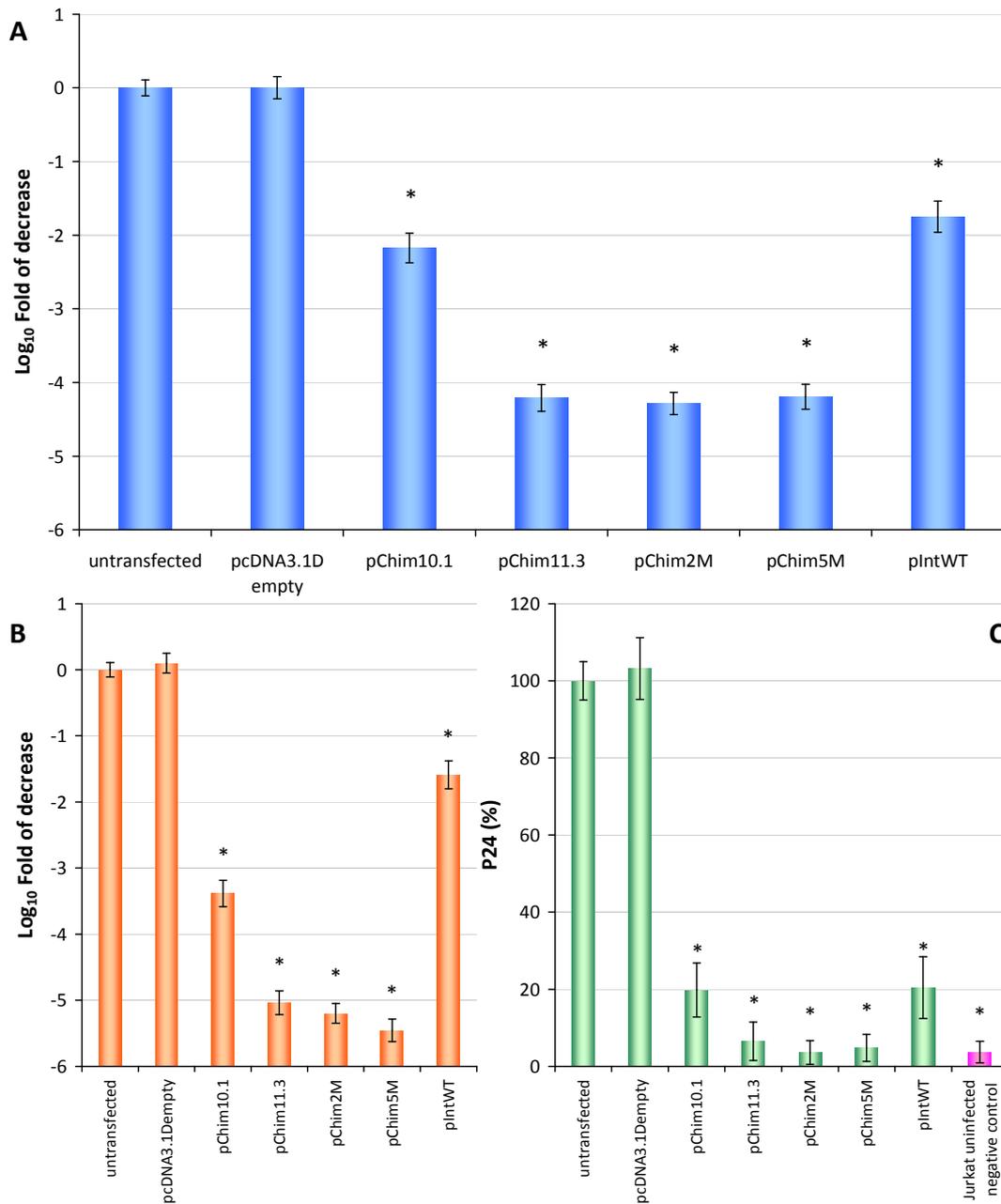


Figura 12: Dosaggio di tre diversi markers virali nelle colture di cellule 8E5LAV transfettate stabilmente con i cloni di chimerici. A) Quantificazione del DNA provirale mediante qPCR, espresso come decrementi in Log₁₀ rispetto al controllo 8E5LAV-pcDNA3.1Dempty. B) Quantificazione del RNA virale mediante qRT-PCR, espresso come decrementi in Log₁₀ rispetto al controllo 8E5LAV-pcDNA3.1Dempty. C) Quantificazione della proteina virale 24 metodica ELFA, espresso come decrementi in percentuale rispetto al controllo 8E5LAV-pcDNA3.1Dempty. Le barre rappresentano il valore medio di tre esperimenti in duplicato, barra d'errore è la SD, rispetto al controllo Jurkat-pcDNA3.1Dempty. * p<0,01 test T di Student.

5. DISCUSSIONE

Ad oggi esistono pochi dati relativi ai markers di *turnover* osseo nei pazienti HIV-positivi in corso di terapia HAART. Alcuni studi mostrano un incremento di osteocalcina (OC) e crosslaps (CTx) (Brown *et al.*, 2011; Stellbrink *et al.*, 2010) ed evidenziano una correlazione con la riduzione della *bone mineral density* (BMD) (Stellbrink *et al.*, 2010). Tuttavia altri autori mostrano un decremento nei livelli plasmatici di OC in pazienti trattati con HAART (Hernández Quero *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 1995). I nostri dati confermano parallelamente un incremento nei markers di formazione di nuova matrice ossea (OC) e riassorbimento osseo (CTx) dall'inizio della HAART, con un picco alla 24 settimana di trattamento (Focà *et al.*, 2012). In contrasto con quanto precedentemente osservato (Brown *et al.*, 2011), abbiamo potuto rilevare un significativo incremento di OPG a seguito della HAART. Gli autori ipotizzano nel loro studio che il calo dell'infiammazione a seguito della HAART possa ridurre i livelli di OPG. Nel nostro studio i parametri infiammatori non sono stati determinati, ciò nonostante tutti i pazienti hanno ridotto con successo la viremia a valori non rilevabili di HIV RNA, ovvero la fonte primaria di infiammazione, conseguentemente i fattori coinvolti potrebbero essere altri. L'età avanzata e alti valori di viremia all'arruolamento sono indipendentemente predittivi dell'incremento di CTx durante il follow-up.

Poiché l'incremento nella conta delle cellule T CD4+ è maggiore nei pazienti con alti valori di viremia all'arruolamento (Bennett *et al.*, 2002; Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe (COHERE) Study Group *et al.*, 2008), la correlazione tra alti livelli di HIV RNA e aumento di CTx potrebbe essere mediata dall'immunoricostruzione (Ofotokun *et al.*, 2011). Ciononostante, non è stato possibile mettere in evidenza correlazioni statisticamente significative tra Δ [wk 48-b] della conta di cellule T CD4+ e l'aumento di CTx e ciò sembra andare in contrasto con quanto precedentemente ipotizzato (Ofotokun *et al.*, 2011). Pertanto, l'incremento di CTx può essere dovuto al fatto che l'integrità ossea risulta alterata in pazienti anziani a causa dell'età stessa, mentre nei pazienti sieropositivi risulta alterata per un danno diretto del virus stesso sull'osso (Fausto *et al.*, 2006; Onen *et al.*, 2010). Tuttavia il meccanismo che sottende questa alterazione necessita ulteriori studi.

È interessante notare come, nel nostro studio, sia stato possibile evidenziare l'associazione tra regime terapeutico comprendente ATV/r e incremento nei livelli di CTx. Nello studio di Brown *et al.* (2011) è stato osservato un aumento di OC, ma non di CTx, in regimi terapeutici basati su farmaci della classe PI. Questa apparente incongruenza mette in evidenza in realtà come la classe dei farmaci inibitori della proteasi virale sia associata con un aumento del rimodellamento osseo. Sebbene non sia possibile chiarire il meccanismo di questa alterazione metabolica, McComsey *et al.* (McComsey *et al.*, 2011) sono stati in grado di dimostrare il profondo effetto che ATV/r ha sulla BMD a livello delle vertebre lombari, se confrontato con l'impatto che ha invece la terapia con EFV, quando sono in presenza di TDF. I dati del nostro studio coincidono con queste osservazioni e possono fornire in parte una spiegazione a danno osservato.

I dati mostrati evidenziano, inoltre, un significativo aumento di PTH dopo l'inizio della HAART, confermando precedenti studi (Masiá *et al.*, 2012; Rosenvinge *et al.*, 2010; van Vonderen *et al.*, 2009). Questo incremento può essere imputato a bassi livelli di 25-(OH) vitamina D. Purtroppo nel nostro studio sono stati dosati i livelli plasmatici della sola 1,25-(OH)₂ vitamina D, quindi non è possibile supportare l'ipotesi riguardate l'aumento del PTH. L'interesse per la vitamina D nella sua forma diidrossilata nasce dal fatto che questo stato rappresenta la forma matura della vitamina, quella con attività biologica (Henry, 2011).

Nel nostro studio i livelli di 1,25-(OH)₂ vitamina D si sono mantenuti sostanzialmente stabili, mentre altri studi mostrano come il TDF ne promuova l'aumento (Aukrust *et al.*, 1999; Haug *et al.*, 1998). La stabilità osservata è risultata indipendente dalla stagionalità dei prelievi ematici, sebbene altri studi non confermino questi dati (Mueller *et al.*, 2010). Ne risulta che l'effetto del TDF sulla 1,25-(OH)₂ vitamina D necessita ulteriori studi.

Questo studio prende in analisi solamente markers plasmatici e altri parametri vitali, ciò comporta una serie di limitazioni. Anzitutto, non è stato possibile valutare i parametri di BMD, quindi non abbiamo potuto associare l'attivazione dei markers ossei con una riduzione della massa ossea quantificata dalla BMD. Inoltre non ci è stato possibile definire i possibili meccanismi alla base delle alterazioni osservate. Ad esempio, non è stato possibile definire se l'aumento dei markers ossei sia dovuto

all'incremento nei livelli di PTH o ad un danno diretto della terapia antiretrovirale sul metabolismo osseo. Nonostante questi noti limiti, questo studio ha aggiunto importanti informazioni su una tematica non molto approfondita dalla letteratura.

Per quanto concerne il secondo progetto, ovvero lo studio degli effetti biologici dei farmaci sul citotipo deputato alla sintesi di nuova matrice ossea, gli osteoblasti, i dati di letteratura ci dicono quanto siano cruciali le citochine OPG e RANKL nel controllo del metabolismo osseo. Inoltre, l'alterazione del rapporto OPG/RANKL può influire sull'omeostasi ossea (Gibellini *et al.*, 2007, 2012b; Matsuo and Irie, 2008). RANKL in con M-CSF regolano il differenziamento osteoclastico e il riassorbimento osseo, attività parallela alla sintesi di nuovo osso da parte degli osteoblasti, mentre OPG inibisce l'interazione il recettore RANK e il ligando RANKL sulla membrana della cellula bersaglio modulando negativamente l'effetto di RANKL (Väänänen and Laitala-Leinonen, 2008; Wright, 2009).

Dati di letteratura (Gibellini *et al.*, 2008; Mora *et al.*, 2007) dimostrano come il rapporto OPG/RANKL risulti alterato dall'infezione da HIV, per questo motivo con questo studio abbiamo voluto studiare gli effetti dei farmaci utilizzati nella terapia antiretrovirale combinata (cART) su colture cellulari osteoblastiche umane di cellule HOBIT, andando a dosare i livelli di OPG e RANKL nel surnatante delle colture a tempi precoci, valutando insieme gli effetti dei farmaci sulla vitalità cellulare. Il modello cellulare studiato è stato scelto in quanto gli osteoblasti rappresentano un'importante fonte di RANKL e OPG, giocando un ruolo centrale nel controllo della massa ossea e dell'equilibrio del calcio.

L'attività dei farmaci ad azione antiretrovirale sulla struttura dell'osso è tutt'ora ambigua. Tuttavia, un approfondito studio di meta-analisi (Brown and Qaqish, 2006) suggerisce l'esistenza di una relazione tra impiego di farmaci inibitori della proteasi (PI) e perdita di massa ossea. Alcuni studi, condotti su modelli murini, hanno evidenziato come solo alcuni PI, come nelfinavir, saquinavir, indinavir e ritonavir, inducano un aumento del riassorbimento osseo, mentre lopinavir e amprenavir non inducono alcuna alterazione ossea (Jain and Lenhard, 2002). Saquinavir è in grado di interferire con la degradazione di TRAF-6 (*tumor necrosis factor receptor-associated protein*

6), fattore coinvolto nella regolazione negativa del differenziamento e sopravvivenza degli osteoclasti (Fakruddin and Laurence, 2003).

Sono stati compiuti, inoltre, studi sull'interazione tra PI e osteoblasti. Da questi è emerso il ruolo di indinavir, ma non saquinavir, nel provocare un decremento nell'attività biologica degli osteoblasti, riducendo l'attività della fosfatasi alcalina, riducendo la fissazione del calcio e l'espressione del fattore di differenziamento osteoblastico RUNX-2 (Malizia *et al.*, 2007). Inoltre, alcuni farmaci PI inibiscono il metabolismo della vitamina D, con un conseguente danno e calo della massa ossea. Tra questi, indinavir agisce negativamente sull'enzima 1α -idrossilasi e, in maniera meno marcata, l'enzima 25-idrossilasi con un conseguente calo nella produzione di 1,25-didrossivitamina D3 (Cozzolino *et al.*, 2003; Dusso *et al.*, 2000).

Nello studio mostrato, è stata utilizzata una linea cellulare osteoblastica umana e gli effetti dei farmaci sono stati valutati quantificando la secrezione delle citochine OPG e RANKL. I dati mostrati, relativi alle fasi precoci post-trattamento (24-48 ore) mostrano variazioni positive o negative solamente in presenza della concentrazione ottimale (C2) del PI o maggiore (C3).

La nostra attenzione, in questa prima fase dello studio, si è focalizzata su cinque inibitori della proteasi virale: saquinavir, atazanavir, indinavir, fosamprenavir e darunavir. Saquinavir, atazanavir e indinavir non hanno evidenziato alcun effetto statisticamente rilevante sulla secrezione di OPG e RANKL nel surnatante di coltura a nessuna delle concentrazioni testate. Fosamprenavir, però, può indurre a C2 un consistente e significativo incremento nella secrezione di OPG, contrapposto ad un calo nella secrezione di RANKL, ciò comporta un aumento considerevole del rapporto OPG/RANKL (21,8 vs 6,9 a 24 ore e 17,7 vs 6,4 a 48 ore). Da notare come fosamprenavir utilizzato alla concentrazione C3 confermi l'incremento di OPG, mancando però nel mantenere RANKL regolato negativamente. Ciò suggerisce che la concentrazione C2 sia quella ottimale per indurre un calo di RANKL, mentre C3 può attivare o inibire specifici *pathways* intracellulari che vanno ad interferire con il calo di RANKL. Questo fenomeno è noto e in letteratura troviamo diversi esempi di molecole in grado di indurre specifici effetti biologici a concentrazioni ottimali, ma, nel caso si aumenti la concentrazione, possiamo assistere ad un effetto biologico opposto

(Levine and Manley, 1989). Quindi fosamprenavir a C2, a tempi precoci post-trattamento, può mostrare un effetto positivo sull'attività anabolica degli osteoblasti.

Tipranavir induce un decremento di RANKL e OPG nel surnatante di coltura, con un moderato incremento del rapporto OPG/RANKL in presenza delle concentrazioni C2 o C3. Inoltre, tipranavir, ma non tutti i PI testati, può indurre una leggera ma significativa attivazione dell'apoptosi alla concentrazione C3. Perciò, quando le colture cellulari sono state trattate con la concentrazione C3 di tipranavir, è possibile che il decremento delle citochine RANKL e OPG possa essere dovuto proprio all'effetto pro-apoptotico del farmaco e non ad uno specifico meccanismo.

L'analisi degli effetti a tempi precoci di tipranavir a C2 suggerisce che il contemporaneo calo di RANKL e OPG, con relativo incremento del rapporto OPG/RANKL, probabilmente non interferisce con l'equilibrio generale del microambiente osseo. Al contrario, tipranavir gioca un ruolo negativo ad alte concentrazioni perché induce apoptosi nelle cellule osteoblastiche. Darunavir ha evidenziato uno specifico incremento nella secrezione di RANKL a 24 ore post-trattamento alla concentrazione C3, con un moderato incremento nel rapporto OPG/RANKL. Questa attivazione transiente di RANKL risulta interessante poiché evidenzia come concentrazioni troppo elevate di darunavir possano potenzialmente indurre un incremento di RANKL e quindi promuovere teoricamente l'attivazione degli osteoclasti e il riassorbimento osseo, specialmente in trattamenti prolungati con possibile accumulo del farmaco.

Sarà sicuramente interessante valutare i livelli di OPG e RANKL anche con altri composti inibitori della proteasi virale, in associazione con il farmaco booster ritonavir e con il backbone nucleico di terapia. In questo ambito i dati che emergono dal nostro studio riguardano lo studio della vitalità di colture di cellule HOBIT in presenza di alcuni tra i principali farmaci utilizzati nella pratica clinica. I dati che emergono dall'analisi citometrica dell'apoptosi cellulare mettono in evidenza come il ritonavir, farmaco sempre associato ai composti della classe PI per aumentarne l'assorbimento a livello epatico, induca anch'esso alla concentrazione C3 un significativo aumento dell'apoptosi, specialmente se valutata a 7 giorni dal trattamento. Inoltre, le cellule osteoblastiche, se trattate con stessi farmaci inibitori della proteasi in presenza di ritonavir, mostrano livelli apoptotici più elevati rispetto a quelli indotti

dai farmaci singolarmente (+5/10%). In aggiunta, saquinavir, che non mostra evidenti segni di apoptosi in nessuna condizione sperimentale, se associato al ritonavir, evidenzia significativi livelli di apoptosi già a 72 ore dal trattamento a C3.

Una volta che abbiamo spostato la nostra attenzione su farmaci di altre categorie, come inibitori della trascrittasi virale, sia nucleosidici, sia non-nucleosidici, inibitori dell'entry virale o inibitori dell'integrasi, è risultato evidente come questi siano meno proni ad indurre apoptosi nelle cellule HOBIT. Solamente efavirenz, alla concentrazione C3, induce significativi livelli di apoptosi già a 72 ore dal trattamento, pur avendo un meccanismo di azione completamente diverso dagli inibitori della proteasi. Questo getta un'ombra oscura anche su altri composti utilizzati quotidianamente nella pratica clinica, non solo sugli inibitori della proteasi.

Tuttavia, quando abbiamo testato questi composti nella loro formulazione effettiva, ovvero associati al backbone terapeutico costituito da tenofovir ed emtricitabina alla concentrazione C2, non sono stati riscontrati significativi livelli di apoptosi. Solamente la formulazione con nelfinavir come "terzo farmaco" (FTC+TEN+NFV/r) ha mostrato un debole aumento dell'apoptosi a 7 giorni dal trattamento, seppur non statisticamente significativo.

In ultimo, l'effetto di queste formulazioni è stato valutato a livello del trascrittoma delle cellule HOBIT, ricercando mRNA di diversi markers di formazione di nuova matrice ossea e differenziamento osteoblastico, tra cui fosfatasi alcalina, osteocalcina, RUNX-2 e PTHR1. Nel caso della formulazione con raltegravir osserviamo un effetto quasi protettivo, con un lieve ma significativo aumento di tutti i markers analizzati già a 72 ore dal trattamento con C2 di ciascun farmaco, mentre altri farmaci come maraviroc e neviraprina non mostrano sostanziali alterazioni rispetto al controllo non trattato.

Spostando la nostra attenzione sulle formulazioni a base di PI/r (FTC+TEN+SAQ/r e FTC+TEN+NFV/r) emerge un quadro dove fosfatasi alcalina e osteocalcina risultano regolati negativamente dal trattamento, già a 72 ore post-trattamento, così come in un maniera più tardiva risulta deregolato PTHR1 nella formula con NFV/r.

Risulta evidente come non vi sia correlazione diretta tra apoptosi e alterazioni dei markers ossei. Tuttavia queste variazioni nel trascrittoma delle cellule osteobla-

stiche, a seguito del trattamento con terapia basata sui farmaci inibitori della proteasi, rispetto alle cellule non trattate, possono in parte giustificare gli squilibri a livello osseo registrati in pazienti sottoposti a terapia HAART.

Questo studio ha permesso di mettere in evidenza la correlazione tra trattamento e alterazioni nella sintesi di nuova matrice ossea, tuttavia ulteriori studi sono fondamentali per far luce sui meccanismi, diretti o indiretti, attraverso cui avviene il danno ai *pathways* regolativi e differenziativi.

Infine, i risultati del terzo progetto mettono in evidenza un nuovo approccio al problema dell'eradicazione del virus HIV-1. Da questa necessità concreta è nata, infatti, l'idea di utilizzare la proteina integrasi di HIV-1 contro il virus stesso, sfruttando la sua naturale affinità per il DNA provirale per veicolare sulle sequenze LTR del genoma di HIV il sito catalitico di una endonucleasi. Il sistema sarebbe inoltre in grado di avvalersi del meccanismo cellulare di DNA *repair* per rimediare al taglio operato dal costrutto sui due filamenti di DNA (DSBs NHEJ) (Ciccia and Elledge, 2010).

La clonazione e mutagenesi delle proteine chimeriche, composte dall'integrasi virale (isolato clinico, sottotipo B) e dal dominio catalitico C-terminale dell'endonucleasi FokI, è stata problematica in un primo momento. Non è stato infatti possibile isolare colonie di cellule batteriche competenti trasformate con un clone *wild type* dalla sequenza integra, in quanto tossiche per le cellule batteriche. È stato necessario introdurre due mutazioni puntiformi nel dominio C-terminale dell'integrasi per ottenere un clone stabile con la sequenza nucleotidica attesa, nonostante le cellule batteriche ben tollerassero le porzioni separate che formano la proteina chimerica, integrasi e FokI-CTD (Wayengera, 2011).

Per cancellare, o almeno mitigare, l'effetto nocivo della chimera *wild type*, sono state introdotte due mutazioni sito-specifiche sul dominio C-terminale dell'integrasi (R262A e R263A). La regione in cui cadono questi residui, infatti, contiene un motivo composto da aminoacidi carichi positivamente (Chiu and Davies, 2004), responsabile di un'interazione non-specifica integrasi/DNA. Aver reso a carica neutra questi aminoacidi ha reso il costrutto non-tossico, evidenziando quanto questo dominio sia critico per la funzionalità dell'integrasi stessa.

Procedendo in tal senso sono stati generati altri cloni, con un numero maggiore di mutazioni sul dominio C-terminale di integrasi, tutte atte a ridurre l'interazione aspecifica con il DNA (Ceccherini-Silberstein *et al.*, 2009; De Houwer *et al.*, 2012; Semenova *et al.*, 2008).

Inoltre, sono stati costruiti cloni chimerici con delezioni sull'integrasi di HIV-1 del dominio, come la delezione del dominio C-terminale (IN^{Δ213-288}) o la delezione maggiore del dominio catalitico e C-terminale (IN^{Δ51-288}) (Delelis *et al.*, 2008; Eijkelenboom *et al.*, 1999). Seppure queste delezioni siano di una certa entità, van Griensven *et al.* (2004) hanno dimostrato come già l'iperespressione di queste porzioni di integrasi sia di-per-se sufficiente a ridurre l'infezione operata da HIV-1 *in vivo*, su cellule linfoblastoidi CEM, seppure operata con un numero di m.o.i. estremamente basso (0,0001 e 0,00001). Questo lavoro permette di affermare che le modifiche post-traduzionali dell'integrasi, siano esse acetilazioni o SUMOilazioni, che vengono introdotte sul dominio C-terminale della proteina virale, pur essendo critiche per la corretta formazione del complesso di pre-integrazione (PIC) e la successiva integrazione del genoma provirale (Cereseto *et al.*, 2005; Topper *et al.*, 2007; Zamborlini *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011), non risultano essere necessarie per un'interazione diretta di queste integrasi tronche con fattori cellulari come LEDGF (Vanegas *et al.*, 2005), virali o con lo stesso DNA provirale.

L'analisi di immunofluorescenza delle cellule transfettate ha evidenziato come i cloni generati siano in grado di localizzare sia a livello citoplasmatico, sia a livello nucleare. Tuttavia non è stato possibile determinare il meccanismo attraverso cui le proteine chimeriche riescano a penetrare il nucleo una volta sintetizzate, così come non è stato possibile individuare NLS nei costrutti chimerici (Kosugi *et al.*, 2009).

L'infezione con il ceppo di laboratorio HIV-1_{IIIb} delle cellule Jurkat transfettate stabilmente con i cloni contenuti le diverse chimere ha messo in evidenza come, nelle nostre condizioni sperimentali, due cloni su quattro siano in grado di ridurre efficacemente i livelli di proteina virale p24, nonostante un'infezione particolarmente forte con 10 m.o.i., già tre giorni dopo l'infezione. Questi due cloni, in particolare, sono il pChim2M (due mutazioni sul C-terminale di integrasi) e il pChim11.3 (delezione del C-terminale di integrasi) e il risultato ottenuto consiste nella riduzione dell'infezione del 50%. Il clone pChim5M (cinque mutazioni sul C-terminale di inte-

grasi), seppure molto simile al pChim2M non ha prodotto risultati soddisfacenti. In apparenza, sembrerebbe che il dominio C-terminale dell'integrasi, mutagenizzato in 5 aminoacidi diversi, perda la propria funzione di riconoscimento aspecifico del DNA e sito di possibili modifiche post-traduzionali, ma a differenza del clone pChim11.3 che manca completamente di questo dominio, il clone pChim5M conserva ancora questa regione "amorfa". Tuttavia non è stato ancora possibile determinare il meccanismo attraverso cui questa regione mutagenizzata del pChim5M impedisca al clone di dare i medesimi risultati, ottenuti da pChim2M e pChim11.3.

Il clone pIntWT invece riduce debolmente i livelli del marker di infezione. Come osservato in precedenza da van Griensven *et al.* (2004) la sola integrasi, se iperespressa, è in grado di ridurre significativamente l'infezione in cellule CEM. In nostro sistema cellulare è estremamente simile a quello utilizzato in precedenza da van Griensven *et al.*, tuttavia il nostro studio prevedeva un'infezione estremamente più aggressiva, con un numero di m.o.i. almeno 10000 volte superiore a quello. Ciononostante, il clone cellulare che iperesprimeva l'integrasi di HIV-1 è stato in grado di ridurre circa del 20% l'infezione da HIV, pur non raggiungendo la significatività statistica. Con un successivo esperimento a 0,4 m.o.i., sulla linea Jurkat-pChim2M, abbiamo osservato un calo ancora maggiore dei livelli del marker di infezione p24, che si attestano al 70% di riduzione rispetto al controllo anche dopo 9 giorni dall'infezione.

Quando passiamo a studiare il modello cellulare di DNA provirale integrato, ben rappresentato dalle cellule 8E5LAV, che albergano una sola copia integrata di DNA provirale (Folks *et al.*, 1986), otteniamo risultati ancora più incoraggianti. La transfezione stabile di questa linea cellulare, dopo 30 giorni di selezione, ha messo in luce diverse evidenze: la transfezione è ben tollerata dalle cellule, senza evidenti segni di alterazione del ciclo cellulare, i cloni chimerici producono una riduzione estremamente marcata e consistente della proteina virale p24, dell'RNA virale e soprattutto del DNA provirale integrato. Il DNA provirale, infatti, si attesta attorno ad un calo superiore alle 10000 volte rispetto alla popolazione cellulare di controllo, ciò significa che dopo trenta giorni dalla transfezione solamente una cellula su 10000 risulterà ancora HIV-positiva. Questo risultato è stato ottenuto con ben tre cloni, pChim2M, pChim5M e pChim11.3.

Come nel caso dell'infezione sulle linee Jurkat transfettate, i cloni pChim2M e pChim11.3 mostrano una evidente attività inibitoria su HIV. Questo esperimento evidenzia come i due cloni siano in grado di andare ad agire sul DNA provirale integrato, confermando l'ipotesi iniziale del progetto. In aggiunta anche il clone pChim5M ha dato ottimi risultati. È probabile che il maggior tempo di coltura (30 giorni per 8E5LAV vs 3 giorni per Jurkat) sia necessario al clone pChim5M per esprimere la propria attività. Oltre ai cloni già discussi, anche il clone minore pChim10.1 ha evidenziato una significativa attività antiretrovirale.

L'integrasi, iperespressa nella linea 8E5LAV-pIntWT, è effettivamente in grado di indurre la disintegrazione del genoma provirale, come mostrato da esperimenti *in vitro* da Chow *et al.* (1992), riducendo consistentemente ed in modo significativo i diversi markers virali analizzati. Quindi, oltre al ruolo inibitorio su diversi *steps* dell'infezione di HIV-1 analizzati da van Griensven *et al.* (2004), possiamo aggiungere un effetto diretto operato dall'integrasi di HIV-1 sullo stesso genoma provirale integrato nella cellula ospite.

6. CONCLUSIONI

Il significativo e rapido incremento dei markers ossei osservato nel nostro studio (Focà *et al.*, 2012), rafforza la necessità di monitorare costantemente questi parametri per rilevare segni precoci di danno osseo, come sostenuto e riportato nelle *guidelines* alla pratica clinica (Antinori *et al.*, 2012). Inoltre, sono stati messi in luce diversi possibili predittori di alterazioni del metabolismo osseo (come età, viremia, co-somministrazione di ATV/r) le quali possono consentire di individuare pazienti a rischio.

Poiché la correlazione tra incremento dei markers ossei e BMD è già stata confermata da altri studi (Christgau *et al.*, 1998; Knapen *et al.*, 1998), i risultati mostrati possono ritenersi clinicamente significativi. Infine, i markers di *turnover* osseo possono ritenersi fonte aggiuntiva o complementare di informazioni rispetto alla quantificazione della BMD tramite metodica DXA (Borderi *et al.*, 2009; Gibellini *et al.*, 2012b). Tuttavia, sono necessari ulteriori studi, che tengano in considerazione altri possibili parametri e markers plasmatici, così come altre combinazioni di farmaci antiretrovirali, che possano essere messi in correlazione con le alterazioni a carico dell'osso rilevate da metodiche standardizzate come la DXA, o nuove metodiche di diagnosi di osteopenia/osteoporosi, come la ultrasonografia quantitativa, QUS (studio in pubblicazione). Questo permetterà di evidenziare se esistono, e quali sono, altri possibili parametri da monitorare nella pratica clinica (Vasikaran *et al.*, 2011).

Per studiare più a fondo la complessa relazione tra terapia HAART e microambiente osseo abbiamo intrapreso lo studio dell'interazione tra i farmaci che compongono la terapia antiretrovirale e il tipo cellulare responsabile della sintesi di nuova matrice ossea (Gibellini *et al.*, 2010a, 2010b, 2012b). Questo studio mostra come l'equilibrio osseo governato dal rapporto OPG/RANKL risulti alterato, nelle fasi più precoci del trattamento con farmaci antiretrovirali, solo da alcuni composti della classe dei PI.

Lo studio dell'andamento di OPG e RANKL nel caso di trattamento della linea osteoblastica studiata con altri farmaci e combinazioni di questi aiuterà sicuramente a meglio definire le possibili interazioni tra farmaci e citochine pro infiamma-

torie indotte dall'infezione da HIV nell'alterazione della sintesi di OPG e RANKL. Cionondimeno, l'analisi dei livelli di apoptosi ha messo in luce come un effetto di accumulo di taluni farmaci possa innescare meccanismi apoptotici nella linea osteoblastica studiata. Questo però non preclude altre strade attraverso cui alcuni farmaci possano esperire un meccanismo dannoso per la cellula e il suo metabolismo. Infatti, l'analisi di markers di attività e differenziamento osteoblastico ha evidenziato alterazioni nella sintesi di fattori differenziativi (RUNX-2 e PTHR1) e di metabolismo osteoblastico (fosfatasi alcalina e osteocalcina) già a tempi precoci e a concentrazioni fisiologiche dei farmaci testati, in particolare nelle formulazioni che utilizzavano farmaci della classe dei PI. Questo lavoro è solo l'inizio di un progetto più ampio con lo scopo di indagare e comprendere le relazioni che intercorrono tra PI e osteoblasti, con il conseguente squilibrio dell'omeostasi e calo di massa ossea, valutando, inoltre, nuovi parametri utili nel monitoraggio costante del paziente HIV-infetto nel corso della terapia HAART. Fondamentale, infine, approcciare allo stesso modo l'altro della bilancia che regola l'equilibrio dell'osso, gli osteoclasti, valutando gli effetti della terapia sul cross-talk di queste due componenti cellulari.

Come già osservato da Gibellini *et al.* (2008), gli osteoblasti posseggono le caratteristiche recettoriali per essere potenziali *reservoir* di infezione (presenza di CD4, CXCR4 e CCR5), così come le cellule mesenchimali staminali umane (hMSC), precursori degli osteoblasti, risultano infettabili da HIV-1 (Gibellini *et al.*, 2011).

Sebbene siano ancora distanti da una possibile applicazione nella pratica clinica, approcci di terapia genica come possibile cura e arma per l'eradicazione dell'infezione da HIV-1 sono teoricamente possibili (Barton *et al.*, 2012; Lalezari, 2012; June, 2012). Nel nostro progetto abbiamo potuto osservare come i nostri costrutti siano in grado, in effetti, di contrastare il virus, nella sua forma provirale integrata e nelle fasi pre-integrazione. Le linee cellulari da noi utilizzate ben tollerano la presenza di queste proteine chimeriche. Non mostrano infatti alterazioni nel ciclo cellulare, o nella replicazione, siano esse HIV-negative (Jurkat), HIV-positive (8E5LAV) o cellule sane transfettate stabilmente e successivamente infettate. Questo a dimostrazione della selettività delle proteine chimeriche generate nel selezionare con precisione solamente target virali bersaglio dell'integrasi.

Più in generale possiamo affermare che questo studio mostra come sia possibile ingegnerizzare l'integrasi virale, esasperandone l'attività dis-integrativa che è di per-se fortemente sfavorita nel naturale corso dell'infezione da HIV-1, alterandola in parte e fondendola con un nuovo dominio catalitico. Inoltre questo studio potrà condurre, nei suoi sviluppi futuri, a nuove informazioni riguardo un argomento così controverso come la struttura dell'integrasi di HIV-1, riguardo le necessità per quanto concerne la sua attività, come interazioni omomeriche, con altre proteine virali o proteine cellulari (Cherepanov *et al.*, 2005; Jayappa *et al.*, 2012; Maertens, 2003).

In ultima analisi, i risultati che abbiamo ottenuto sono estremamente incoraggianti, in quanto la possibilità di colpire il virus nella sua forma integrata rappresenta lo strumento ideale per contrastare i *reservoir* virali di infezione e pone la base per un nuovo concetto di lotta all'HIV, aprendo la possibilità di future applicazioni *in vivo*.

7. BIBLIOGRAFIA

Albert, J., and Fenyo, E.M. (1990). Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *J Clin Microbiol* *28*, 1560–1564.

Antinori, A., Marcotullio, S., Ammassari, A., Andreoni, M., Angarano, G., Armignacco, O., Carosi, G., Cinque, P., d' Arminio Monforte, A., Di Perri, G., *et al.* (2012). Italian guidelines for the use of antiretroviral agents and the diagnostic-clinical management of HIV-1 infected persons. Update 2011. *New Microbiol.* *35*, 113–159.

Arion, D., Kaushik, N., McCormick, S., Borkow, G., and Parniak, M.A. (1998). Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry* *37*, 15908–15917.

Aukrust, P., Haug, C.J., Ueland, T., Lien, E., Müller, F., Espevik, T., Bollerslev, J., and Frøland, S.S. (1999). Decreased bone formative and enhanced resorptive markers in human immunodeficiency virus infection: indication of normalization of the bone-remodeling process during highly active antiretroviral therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84*, 145–150.

Baldini, G., Ponti, C., Bortul, R., Narducci, P., Grill, V., and Martelli, A.M. (2008). Sparc localizes to the blebs of hobit cells and human primary osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* *104*, 2310–2323.

Barton, K.M., Burch, B.D., Soriano-Sarabia, N., and Margolis, D.M. (2012). Prospects for Treatment of Latent HIV. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* *93*, 46–56.

Bennett, K.K., DeGruttola, V.G., Marschner, I.C., Havlir, D.V., and Richman, D.D. (2002). Baseline predictors of CD4 T-lymphocyte recovery with combination antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *31*, 20–26.

Beumer, K., Bhattacharyya, G., Bibikova, M., Trautman, J.K., and Carroll, D. (2006). Efficient Gene Targeting in *Drosophila* With Zinc-Finger Nucleases. *Genetics* *172*, 2391–2403.

Bitinaite, J., Wah, D.A., Aggarwal, A.K., and Schildkraut, I. (1998). FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *95*, 10570–10575.

Bon, I., Clò, A., Borderi, M., Colangeli, V., Calza, L., Morini, S., Miserocchi, A., Cricca, M., Gibellini, D., and Re, M.C. (2013a). Prevalence of R5 strains in multi-treated HIV subjects and impact of new regimens including maraviroc in a selected group of patients with CCR5-tropic HIV-1 infection. *Int. J. Infect. Dis.* *17*, e875–882.

Bon, I., Lembo, D., Rusnati, M., Clò, A., Morini, S., Miserocchi, A., Bugatti, A., Grigolon, S., Musumeci, G., Landolfo, S., *et al.* (2013b). Peptide-Derivatized SB105-A10 Dendrimer Inhibits the Infectivity of R5 and X4 HIV-1 Strains in Primary PBMCs and Cervicovaginal Histocultures. *PLoS ONE* *8*, e76482.

Bonjoch, A., Pou, C., Pérez-Álvarez, N., Bellido, R., Casadellà, M., Puig, J., Noguera-Julian, M., Clotet, B., Negredo, E., and Paredes, R. (2013). Switching the third drug of antiretroviral therapy to maraviroc in aviraemic subjects: a pilot, prospective, randomized clinical trial. *J. Antimicrob. Chemother.* *68*, 1382–1387.

- Borderi, M., Gibellini, D., Vescini, F., De Crignis, E., Cimatti, L., Biagetti, C., Tampellini, L., and Re, M.C. (2009). Metabolic bone disease in HIV infection. *AIDS* *23*, 1297.
- Brown, T.T., and Qaqish, R.B. (2006). Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *AIDS* *20*, 2165–2174.
- Brown, T.T., Ross, A.C., Storer, N., Labbato, D., and McComsey, G.A. (2011). Bone turnover, osteoprotegerin/RANKL and inflammation with antiretroviral initiation: tenofovir versus non-tenofovir regimens. *Antivir. Ther. (Lond.)* *16*, 1063–1072.
- Brussel, A., Mathez, D., Broche-Pierre, S., Lancar, R., Calvez, T., Sonigo, P., and Leibowitch, J. (2003). Longitudinal monitoring of 2-long terminal repeat circles in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic HIV-1 infection. *AIDS* *17*, 645–652.
- Buck, B.E., Resnick, L., Shah, S.M., and Malinin, T.I. (1990). Human immunodeficiency virus cultured from bone. Implications for transplantation. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 249–253.
- Butler, S.L., Johnson, E.P., and Bushman, F.D. (2002). Human immunodeficiency virus cDNA metabolism: notable stability of two-long terminal repeat circles. *J. Virol.* *76*, 3739–3747.
- Buzón, M.J., Massanella, M., Llibre, J.M., Esteve, A., Dahl, V., Puertas, M.C., Gatell, J.M., Domingo, P., Paredes, R., Sharkey, M., *et al.* (2010). HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat. Med.* *16*, 460–465.
- Canducci, F., Ceresola, E.R., Boeri, E., Spagnuolo, V., Cossarini, F., Castagna, A., Lazzarin, A., and Clementi, M. (2011). Cross-resistance profile of the novel integrase inhibitor Dolutegravir (S/GSK1349572) using clonal viral variants selected in patients failing raltegravir. *J. Infect. Dis.* *204*, 1811–1815.
- Canestri, A., Lescure, F.-X., Jaureguiberry, S., Moulignier, A., Amiel, C., Marcelin, A.G., Peytavin, G., Tubiana, R., Pialoux, G., and Katlama, C. (2010). Discordance between cerebral spinal fluid and plasma HIV replication in patients with neurological symptoms who are receiving suppressive antiretroviral therapy. *Clin. Infect. Dis.* *50*, 773–778.
- Cathomen, T., and Keith Joung, J. (2008). Zinc-finger Nucleases: The Next Generation Emerges. *Mol Ther* *16*, 1200–1207.
- Ceccherini-Silberstein, F., Malet, I., D'Arrigo, R., Antinori, A., Marcelin, A.-G., and Perno, C.-F. (2009). Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation. *AIDS Rev* *11*, 17–29.
- Cereseto, A., Manganaro, L., Gutierrez, M.I., Terreni, M., Fittipaldi, A., Lusic, M., Marcello, A., and Giacca, M. (2005). Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *EMBO J* *24*, 3070–3081.
- Chen, H., Wei, S.Q., and Engelman, A. (1999). Multiple integrase functions are required to form the native structure of the human immunodeficiency virus type I intasome. *J. Biol. Chem.* *274*, 17358–17364.

- Cherepanov, P., Pluymers, W., Claeys, A., Proost, P., De Clercq, E., and Debysers, Z. (2000). High-level expression of active HIV-1 integrase from a synthetic gene in human cells. *The FASEB Journal* *14*, 1389–1399.
- Cherepanov, P., Sun, Z.-Y.J., Rahman, S., Maertens, G., Wagner, G., and Engelman, A. (2005). Solution structure of the HIV-1 integrase-binding domain in LEDGF/p75. *Nat. Struct. Mol. Biol* *12*, 526–532.
- Chiu, T., and Davies, D. (2004). Structure and Function of HIV-1 Integrase. *Current Topics in Medicinal Chemistry* *4*, 965–977.
- Chow, S.A., Vincent, K.A., Ellison, V., and Brown, P.O. (1992). Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. *Science* *255*, 723–726.
- Christgau, S., Rosenquist, C., Alexandersen, P., Bjarnason, N.H., Ravn, P., Fledelius, C., Herling, C., Qvist, P., and Christiansen, C. (1998). Clinical evaluation of the Serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clin. Chem.* *44*, 2290–2300.
- Chun, T.W., Finzi, D., Margolick, J., Chadwick, K., Schwartz, D., and Siliciano, R.F. (1995). *In vivo* fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat. Med.* *1*, 1284–1290.
- Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., *et al.* (1997). Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* *387*, 183–188.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell* *40*, 179–204.
- Cohen, C., Elion, R., Ruane, P., Shamblaw, D., DeJesus, E., Rashbaum, B., Chuck, S.L., Yale, K., Liu, H.C., Warren, D.R., *et al.* (2011). Randomized, phase 2 evaluation of two single-tablet regimens elvitegravir/cobicistat/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate versus efavirenz/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate for the initial treatment of HIV infection. *AIDS* *25*, F7–12.
- Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe (COHERE) Study Group, Sabin, C.A., Smith, C.J., d' Arminio Monforte, A., Battegay, M., Gabiano, C., Galli, L., Geelen, S., Gibb, D., Guiguet, M., *et al.* (2008). Response to combination antiretroviral therapy: variation by age. *AIDS* *22*, 1463–1473.
- Cozzolino, M., Vidal, M., Arcidiacono, M.V., Tebas, P., Yarasheski, K.E., and Dusso, A.S. (2003). HIV-protease inhibitors impair vitamin D bioactivation to 1,25-dihydroxyvitamin D. *AIDS* *17*, 513–520.
- Das, K., and Arnold, E. (2013). HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1. *Current Opinion in Virology* *3*, 111–118.
- Datapharm Communications Ltd. *The Medicines Compendium* (2008). Electronic Medicine Compendium.

Datta, N.S., Samra, T.A., Mahalingam, C.D., Datta, T., and Abou-Samra, A.B. (2010). Role of PTH1R internalization in osteoblasts and bone mass using a phosphorylation-deficient knock-in mouse model. *J. Endocrinol.* *207*, 355–365.

Davey, R.T., Jr, Bhat, N., Yoder, C., Chun, T.W., Metcalf, J.A., Dewar, R., Natarajan, V., Lempicki, R.A., Adelsberger, J.W., Miller, K.D., *et al.* (1999). HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 15109–15114.

Davis, D., and Stokoe, D. (2010). Zinc Finger Nucleases as tools to understand and treat human diseases. *BMC Medicine* *8*, 42.

Delelis, O., Carayon, K., Saïb, A., Deprez, E., and Mouscadet, J.-F. (2008). Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* *5*, 114.

Díaz-Delfín, J., Domingo, P., Giralt, M., and Villarroya, F. (2013). Maraviroc reduces cytokine expression and secretion in human adipose cells without altering adipogenic differentiation. *Cytokine* *61*, 808–815.

Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., *et al.* (2005). Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 4721–4732.

Durai, S., Mani, M., Kandavelou, K., Wu, J., Porteus, M.H., and Chandrasegaran, S. (2005). Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* *33*, 5978–5990.

Dusso, A., Vidal, M., Powderly, W., Yarasheski, K., and Tebas, P. (2000). Protease inhibitors inhibit *in vitro* conversion of 25(OH)-vitamin D to 1,25(OH)₂-vitamin D. (*Antiviral Therapy*), p. 19.

Eijkelenboom, A.P.A.M., Sprangers, R., Hård, K., Puras Lutzke, R.A., Plasterk, R.H.A., Boelens, R., and Kaptein, R. (1999). Refined solution structure of the c-terminal DNA-binding domain of human immunovirus-1 integrase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* *36*, 556–564.

Elion, R., Green, L., Cohen, C., Green, S., Baird, I., Schrader, S., and Ward, D. (1999). An open-label trial of stavudine, lamivudine and efavirenz in the treatment of HIV-positive, treatment-naïve patients, and implications for clinical practice. *Antivir. Ther. (Lond.)* *4 Suppl 3*, 89–91.

Eriksson, S., Graf, E.H., Dahl, V., Strain, M.C., Yukl, S.A., Lysenko, E.S., Bosch, R.J., Lai, J., Chioma, S., Emad, F., *et al.* (2013). Comparative Analysis of Measures of Viral Reservoirs in HIV-1 Eradication Studies. *PLoS Pathog* *9*, e1003174.

Eron, J., Jr, Yeni, P., Gathe, J., Jr, Estrada, V., DeJesus, E., Staszewski, S., Lackey, P., Katlama, C., Young, B., Yau, L., *et al.* (2006). The KLEAN study of fosamprenavir-ritonavir versus lopinavir-ritonavir, each in combination with abacavir-lamivudine, for initial treatment of HIV infection over 48 weeks: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* *368*, 476–482.

- Fakruddin, J.M., and Laurence, J. (2003). HIV envelope gp120-mediated regulation of osteoclastogenesis via receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) secretion and its modulation by certain HIV protease inhibitors through interferon-gamma/RANKL cross-talk. *J. Biol. Chem.* *278*, 48251–48258.
- Fausto, A., Bongiovanni, M., Cicconi, P., Menicagli, L., Ligabò, E.V., Melzi, S., Bini, T., Sardanelli, F., Cornalba, G., and Monforte, A. d'Arminio (2006). Potential predictive factors of osteoporosis in HIV-positive subjects. *Bone* *38*, 893–897.
- Finzi, A., Xiang, S.-H., Pacheco, B., Wang, L., Haight, J., Kassa, A., Danek, B., Pancera, M., Kwong, P.D., and Sodroski, J. (2010). Topological layers in the HIV-1 gp120 inner domain regulate gp41 interaction and CD4-triggered conformational transitions. *Mol. Cell* *37*, 656–667.
- Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L.M., Buck, C., Chaisson, R.E., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., *et al.* (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* *278*, 1295–1300.
- Focà, E., Motta, D., Borderi, M., Gotti, D., Albini, L., Calabresi, A., Izzo, I., Bellagamba, R., Narciso, P., Sighinolfi, L., *et al.* (2012). Prospective evaluation of bone markers, parathormone and 1,25-(OH)₂ vitamin D in HIV-positive patients after the initiation of tenofovir/emtricitabine with atazanavir/ritonavir or efavirenz. *BMC Infectious Diseases* *12*, 38.
- Folks, T.M., Powell, D., Lightfoote, M., Koenig, S., Fauci, A.S., Benn, S., Rabson, A., Daugherty, D., Gendelman, H.E., and Hoggan, M.D. (1986). Biological and biochemical characterization of a cloned Leu-3- cell surviving infection with the acquired immune deficiency syndrome retrovirus. *J. Exp. Med.* *164*, 280–290.
- Frankel, A.D., and Young, J.A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 1–25.
- Fung, H.B., Stone, E.A., and Piacenti, F.J. (2002). Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin Ther* *24*, 1515–1548.
- Gartner, S., and Popovic, M. (1990). *Virus isolation and production* (New York, Stockton Press: Aldovini, A. and Walker, B. D.).
- Geeraert, L., Kraus, G., and Pomerantz, R.J. (2008). Hide-and-seek: the challenge of viral persistence in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Med.* *59*, 487–501.
- Gibellini, D., Vitone, F., Gori, E., La Placa, M., and Re, M.C. (2004a). Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients. *J. Virol. Methods* *115*, 183–189.
- Gibellini, D., Vitone, F., Schiavone, P., Ponti, C., La Placa, M., and Re, M.C. (2004b). Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells by SYBR green real-time PCR technique. *J. Clin. Virol.* *29*, 282–289.
- Gibellini, D., Borderi, M., De Crignis, E., Cicola, R., Vescini, F., Caudarella, R., Chiodo, F., and Re, M.C. (2007). RANKL/OPG/TRAIL plasma levels and bone mass loss evaluation in antiretroviral naive HIV-1-positive men. *J. Med. Virol.* *79*, 1446–1454.

- Gibellini, D., De Crignis, E., Ponti, C., Cimatti, L., Borderi, M., Tschon, M., Giardino, R., and Re, M.C. (2008). HIV-1 triggers apoptosis in primary osteoblasts and HOBIT cells through TNF α activation. *J. Med. Virol.* *80*, 1507–1514.
- Gibellini, D., Borderi, M., De Crignis, E., Clò, A., Miserocchi, A., Viale, P., and Re, M.C. (2010a). Analysis of the effects of specific protease inhibitors on OPG/RANKL regulation in an osteoblast-like cell line. *The New Microbiologica* *33*, 109.
- Gibellini, D., De Crignis, E., Ponti, C., Borderi, M., Clò, A., Miserocchi, A., Viale, P., and Carla Re, M. (2010b). HIV-1 Tat protein enhances RANKL/M-CSF-mediated osteoclast differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *401*, 429–434.
- Gibellini, D., Alviano, F., Miserocchi, A., Tazzari, P.L., Ricci, F., Clò, A., Morini, S., Borderi, M., Viale, P., Pasquinelli, G., *et al.* (2011). HIV-1 and recombinant gp120 affect the survival and differentiation of human vessel wall-derived mesenchymal stem cells. *Retrovirology* *8*, 40.
- Gibellini, D., Miserocchi, A., Tazzari, P.L., Ricci, F., Clò, A., Morini, S., Ponti, C., Pasquinelli, G., Bon, I., Pagliaro, P., *et al.* (2012a). Analysis of the effects of HIV-1 Tat on the survival and differentiation of vessel wall-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry* *113*, 1132–1141.
- Gibellini, D., Borderi, M., Vanino, E., Clò, A., Morini, S., Calza, L., Re, M.C., and Viale, P. (2012b). Molecular Bases of Osteoporosis in HIV: The Role of the Virus and Antiretroviral Therapy. *Clinic Rev Bone Miner Metab* *10*, 236–245.
- Goodsell, D.S. (2000). HIV-1 Protease. RCSB Protein Data Bank.
- Goodsell, D.S. (2002). Reverse Transcriptase. RCSB Protein Data Bank.
- Gordley, R.M., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2009). Synthesis of programmable integrases. *PNAS* *106*, 5053–5058.
- Van Griensven, J., Zhan, X., Van Maele, B., Pluymers, W., Michiels, M., De Clercq, E., Cherepanov, P., and Debyser, Z. (2004). Expression of HIV-1 integrase in CEM cells inhibits HIV-1 replication. *The Journal of Gene Medicine* *6*, 268–277.
- De Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N., and Summers, M.F. (1998). Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element. *Science* *279*, 384–388.
- Haqqani, A.A., and Tilton, J.C. (2013). Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Research* *98*, 158–170.
- Haug, C.J., Aukrust, P., Haug, E., Mørkrid, L., Müller, F., and Frøland, S.S. (1998). Severe deficiency of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human immunodeficiency virus infection: association with immunological hyperactivity and only minor changes in calcium homeostasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *83*, 3832–3838.
- Henry, H.L. (2011). Regulation of vitamin D metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* *25*, 531–541.

- Hernández Quero, J., Ortego Centeno, N., Muñoz-Torres, M., Martínez Pérez, M.A., and Higuera Torres-Puchol, J.M. (1993). Alterations in bone turnover in HIV-positive patients. *Infection* *21*, 220–222.
- Ho, H.-T., Fan, L., Nowicka-Sans, B., McAuliffe, B., Li, C.-B., Yamanaka, G., Zhou, N., Fang, H., Dicker, I., Dalterio, R., *et al.* (2006). Envelope conformational changes induced by human immunodeficiency virus type 1 attachment inhibitors prevent CD4 binding and downstream entry events. *J. Virol.* *80*, 4017–4025.
- De Houwer, S., Demeulemeester, J., Thys, W., Taltynov, O., Christ, F., and Debysers, Z. (2012). Identification of residues in the C-terminal domain of HIV-1 integrase that mediate binding to TRN-SR2. *Journal of Biological Chemistry*.
- Huang, C.-C., Lam, S.N., Acharya, P., Tang, M., Xiang, S.-H., Hussan, S.S.-U., Stanfield, R.L., Robinson, J., Sodroski, J., Wilson, I.A., *et al.* (2007). Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* *317*, 1930–1934.
- Ibáñez, A., Puig, T., Elias, J., Clotet, B., Ruiz, L., and Martínez, M.A. (1999). Quantification of integrated and total HIV-1 DNA after long-term highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected patients. *AIDS* *13*, 1045–1049.
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D., Jr, Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L., and Clark, P. (1993). Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 6320–6324.
- Jacque, J.-M., and Stevenson, M. (2006). The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity. *Nature* *441*, 641–645.
- Jain, R.G., and Lenhard, J.M. (2002). Select HIV protease inhibitors alter bone and fat metabolism *ex vivo*. *J. Biol. Chem.* *277*, 19247–19250.
- James, J.S. (1998). Efavirenz (Sustiva) may equal or exceed protease inhibitor in initial anti-retroviral combination. *AIDS Treat News* 1–3.
- Jayappa, K.D., Ao, Z., and Yao, X. (2012). The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration. *Int J Biochem Mol Biol* *3*, 70–85.
- June, C. (2012). Introduction of acquired CCR5 deficiency with zinc finger nuclease-modified autologous CD4 T cells (SB-728-T) correlates with increases in CD4 count and effects on viral load in HIV-infected subjects. (Seattle, WA, USA),.
- Kearney, B.P., Yale, K., Shah, J., Zhong, L., and Flaherty, J.F. (2006). Pharmacokinetics and dosing recommendations of tenofovir disoproxil fumarate in hepatic or renal impairment. *Clin Pharmacokinet* *45*, 1115–1124.
- Khalid, O., Baniwal, S.K., Purcell, D.J., Leclerc, N., Gabet, Y., Stallcup, M.R., Coetzee, G.A., and Frenkel, B. (2008). Modulation of Runx2 activity by estrogen receptor- α : implications for osteoporosis and breast cancer. *Endocrinology* *149*, 5984–5995.

- Kilby, J.M., Lalezari, J.P., Eron, J.J., Carlson, M., Cohen, C., Arduino, R.C., Goodgame, J.C., Gallant, J.E., Volberding, P., Murphy, R.L., *et al.* (2002). The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *18*, 685–693.
- Kim, Y.-H., Kwak, K.-A., Gil, H.-W., Song, H.-Y., and Hong, S.-Y. (2013). Indoxyl sulfate promotes apoptosis in cultured osteoblast cells. *BMC Pharmacol Toxicol* *14*, 60.
- Knapen, M.H., Nieuwenhuijzen Kruseman, A.C., Wouters, R.S., and Vermeer, C. (1998). Correlation of serum osteocalcin fractions with bone mineral density in women during the first 10 years after menopause. *Calcif. Tissue Int.* *63*, 375–379.
- Koelsch, K.K., Liu, L., Haubrich, R., May, S., Havlir, D., Günthard, H.F., Ignacio, C.C., Campos-Soto, P., Little, S.J., Shafer, R., *et al.* (2008). Dynamics of total, linear nonintegrated, and integrated HIV-1 DNA *in vivo* and *in vitro*. *J. Infect. Dis.* *197*, 411–419.
- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., and Steitz, T.A. (1992). Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* *256*, 1783–1790.
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., and Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 10171–10176.
- Krishnan, L., and Engelman, A. (2012). Retroviral Integrase Proteins and HIV-1 DNA Integration. *J. Biol. Chem.* *287*, 40858–40866.
- Kwon, Y.D., Finzi, A., Wu, X., Dogo-Isonagie, C., Lee, L.K., Moore, L.R., Schmidt, S.D., Stuckey, J., Yang, Y., Zhou, T., *et al.* (2012). Unliganded HIV-1 gp120 core structures assume the CD4-bound conformation with regulation by quaternary interactions and variable loops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 5663–5668.
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., and Hendrickson, W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* *393*, 648–659.
- Lalezari, J. (2012). A single infusion of zinc finger nuclease CCR5 modified autologous CD4 T cells (SB-728-T) increases CD4 counts and leads to decrease in HIV proviral load in an aviremic HIV-infected subject. (Seattle, WA, USA),
- Lalezari, J.P., Eron, J.J., Carlson, M., Cohen, C., DeJesus, E., Arduino, R.C., Gallant, J.E., Volberding, P., Murphy, R.L., Valentine, F., *et al.* (2003). A phase II clinical study of the long-term safety and antiviral activity of enfuvirtide-based antiretroviral therapy. *AIDS* *17*, 691–698.
- Landonio, S., Quirino, T., Bonfanti, P., Gabris, A., Boccassini, L., Gulisano, C., Vulpio, L., Ricci, E., Carrabba, M., and Vigevani, G.M. (2004). Osteopenia and osteoporosis in HIV+ patients, untreated or receiving HAART. *Biomed. Pharmacother* *58*, 505–508.
- Lennox, J.L. (2012). The use of HIV-1 integrase inhibitors in antiretroviral naive patients: Current Opinion in HIV and AIDS *7*, 409–414.

- Lennox, J.L., DeJesus, E., Lazzarin, A., Pollard, R.B., Madruga, J.V.R., Berger, D.S., Zhao, J., Xu, X., Williams-Diaz, A., Rodgers, A.J., *et al.* (2009). Safety and efficacy of raltegravir-based versus efavirenz-based combination therapy in treatment-naïve patients with HIV-1 infection: a multicentre, double-blind randomised controlled trial. *Lancet* *374*, 796–806.
- Lennox, J.L., DeJesus, E., Berger, D.S., Lazzarin, A., Pollard, R.B., Ramalho Madruga, J.V., Zhao, J., Wan, H., Gilbert, C.L., Tepler, H., *et al.* (2010). Raltegravir versus Efavirenz regimens in treatment-naïve HIV-1-infected patients: 96-week efficacy, durability, subgroup, safety, and metabolic analyses. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *55*, 39–48.
- Leonard, C.K., Spellman, M.W., Riddle, L., Harris, R.J., Thomas, J.N., and Gregory, T.J. (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* *265*, 10373–10382.
- Levine, M., and Manley, J.L. (1989). Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell* *59*, 405–408.
- Li, L., Wu, L.P., Clarke, R., and Chandrasegaran, S. (1993). C-terminal deletion mutants of the FokI restriction endonuclease. *Gene* *133*, 79–84.
- Li, L., Dahiya, S., Kortagere, S., Aiamkitsumrit, B., Cunningham, D., Pirrone, V., Nonnemacher, M.R., and Wigdahl, B. (2012). Impact of Tat Genetic Variation on HIV-1 Disease. *Advances in Virology* *2012*.
- Van Maele, B., and Debyser, Z. (2005). HIV-1 integration: an interplay between HIV-1 integrase, cellular and viral proteins. *AIDS Rev* *7*, 26–43.
- Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F., and Debyser, Z. (2006). Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends Biochem. Sci.* *31*, 98–105.
- Maertens, G. (2003). LEDGF/p75 Is Essential for Nuclear and Chromosomal Targeting of HIV-1 Integrase in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 33528–33539.
- Malcolm, R.K., Fetherston, S.M., McCoy, C.F., Boyd, P., and Major, I. (2012). Vaginal rings for delivery of HIV microbicides. *Int J Womens Health* *4*, 595–605.
- Malizia, A.P., Cotter, E., Chew, N., Powderly, W.G., and Doran, P.P. (2007). HIV protease inhibitors selectively induce gene expression alterations associated with reduced calcium deposition in primary human osteoblasts. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *23*, 243–250.
- Marchand, C., Johnson, A.A., Semenova, E., and Pommier, Y. (2006). Mechanisms and inhibition of HIV integration. *Drug Discov Today Dis Mech* *3*, 253–260.
- Masiá, M., Padilla, S., Robledano, C., López, N., Ramos, J.M., and Gutiérrez, F. (2012). Early changes in parathyroid hormone concentrations in HIV-infected patients initiating antiretroviral therapy with tenofovir. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *28*, 242–246.
- Mathews, S., Gupta, P.K., Bhonde, R., and Totey, S. (2011). Chitosan enhances mineralization during osteoblast differentiation of human bone marrow - derived mesenchymal stem cells, by upregulating the associated genes. *Cell Proliferation* *44*, 537–549.

- Matsuo, K., and Irie, N. (2008). Osteoclast-osteoblast communication. *Arch. Biochem. Biophys.* *473*, 201–209.
- McComsey, G.A., Kitch, D., Daar, E.S., Tierney, C., Jahed, N.C., Tebas, P., Myers, L., Melbourne, K., Ha, B., and Sax, P.E. (2011). Bone mineral density and fractures in antiretroviral-naïve persons randomized to receive abacavir-lamivudine or tenofovir disoproxil fumarate-emtricitabine along with efavirenz or atazanavir-ritonavir: Aids Clinical Trials Group A5224s, a substudy of ACTG A5202. *J. Infect. Dis.* *203*, 1791–1801.
- Meanwell, N.A., and Kadow, J.F. (2007). Maraviroc, a chemokine CCR5 receptor antagonist for the treatment of HIV infection and AIDS. *Curr Opin Investig Drugs* *8*, 669–681.
- Mellert, W., Kleinschmidt, A., Schmidt, J., Festl, H., Emler, S., Roth, W.K., and Erfle, V. (1990). Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1. *AIDS* *4*, 527–535.
- Meyer, P.R., Matsuura, S.E., So, A.G., and Scott, W.A. (1998). Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 13471–13476.
- Mikl, J., Sulkowski, M.S., Benhamou, Y., Dieterich, D., Pol, S., Rockstroh, J., Robinson, P.A., Ranga, M., and Stern, J.O. (2009). Hepatic profile analyses of tipranavir in Phase II and III clinical trials. *BMC Infect. Dis.* *9*, 203.
- Miller, J.C., Holmes, M.C., Wang, J., Guschin, D.Y., Lee, Y.-L., Rupniewski, I., Beausejour, C.M., Waite, A.J., Wang, N.S., Kim, K.A., *et al.* (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat. Biotechnol.* *25*, 778–785.
- Miller, M.D., Farnet, C.M., and Bushman, F.D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.* *71*, 5382–5390.
- Montaner JG, Reiss P, Cooper D, and et al (1998). A randomized, double-blind trial comparing combinations of nevirapine, didanosine, and zidovudine for hiv-infected patients: The incas trial. *JAMA* *279*, 930–937.
- Mora, S., Zamproni, I., Cafarelli, L., Giacomet, V., Erba, P., Zuccotti, G., and Viganò, A. (2007). Alterations in circulating osteoimmune factors may be responsible for high bone resorption rate in HIV-infected children and adolescents. *AIDS* *21*, 1129–1135.
- Morellet, N., Jullian, N., De Rocquigny, H., Maigret, B., Darlix, J.L., and Roques, B.P. (1992). Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by ¹H NMR. *EMBO J.* *11*, 3059–3065.
- Moyle, G.J., and Back, D. (2001). Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement. *HIV Med.* *2*, 105–113.
- Mueller, N.J., Fux, C.A., Ledergerber, B., Elzi, L., Schmid, P., Dang, T., Magenta, L., Calmy, A., Vergopoulos, A., Bischoff-Ferrari, H.A., *et al.* (2010). High prevalence of severe vitamin D deficiency in combined antiretroviral therapy-naïve and successfully treated Swiss HIV patients. *AIDS* *24*, 1127–1134.

- Muñoz-Barroso, I., Salzwedel, K., Hunter, E., and Blumenthal, R. (1999). Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J. Virol.* *73*, 6089–6092.
- Neve, A., Corrado, A., and Cantatore, F.P. (2013). Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J. Cell. Physiol.* *228*, 1149–1153.
- Ofotokun, I., Weitzmann, N., Vunnava, A., Sheth, A., Villinger, F., Zhou, J., Williams, E., Sanford, S., Rivas, M., and Lennox, J. (2011). HAART-induced immune reconstitution: a driving force behind bone resorption in HIV/AIDS. In 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston MA.
- Onen, N.F., Overton, E.T., Seyfried, W., Stumm, E.R., Snell, M., Mondy, K., and Tebas, P. (2010). Aging and HIV infection: a comparison between older HIV-infected persons and the general population. *HIV Clin Trials* *11*, 100–109.
- Oxenius, A., Price, D.A., Günthard, H.F., Dawson, S.J., Fagard, C., Perrin, L., Fischer, M., Weber, R., Plana, M., García, F., *et al.* (2002). Stimulation of HIV-specific cellular immunity by structured treatment interruption fails to enhance viral control in chronic HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 13747–13752.
- Oz, I., Avidan, O., and Hizi, A. (2002). Inhibition of the integrases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2 by reverse transcriptases. *Biochem J* *361*, 557–566.
- Pascual-Pareja, J.F., Martínez-Prats, L., Luczkowiak, J., Fiorante, S., Rubio, R., Pulido, F., Otero, J.R., and Delgado, R. (2010). Detection of HIV-1 at between 20 and 49 copies per milliliter by the Cobas TaqMan HIV-1 v2.0 assay is associated with higher pretherapy viral load and less time on antiretroviral therapy. *J. Clin. Microbiol.* *48*, 1911–1912.
- Peat, T.S., Rhodes, D.I., Vandegraaff, N., Le, G., Smith, J.A., Clark, L.J., Jones, E.D., Coates, J.A.V., Thienthong, N., Newman, J., *et al.* (2012). Small Molecule Inhibitors of the LEDGF Site of Human Immunodeficiency Virus Integrase Identified by Fragment Screening and Structure Based Design. *PLoS ONE* *7*, e40147.
- Van Peer, G., Mestdagh, P., and Vandesompele, J. (2012). Accurate RT-qPCR gene expression analysis on cell culture lysates. *Sci. Rep.* *2*.
- Pereira, L.A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M.J., and Deacon, N.J. (2000). A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res.* *28*, 663–668.
- Perelson, A.S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M., and Ho, D.D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* *387*, 188–191.
- Perry, C.M., and Benfield, P. (1997). Nelfinavir. *Drugs* *54*, 81–87; discussion 88.
- Peterlin, B.M., and Trono, D. (2003). Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat Rev Immunol* *3*, 97–107.
- Picot, J. (2005). *Human Cell Culture Protocols*, 2nd edition.

- Pierson, T.C., Kieffer, T.L., Ruff, C.T., Buck, C., Gange, S.J., and Siliciano, R.F. (2002). Intrinsic stability of episomal circles formed during human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* *76*, 4138–4144.
- Pingoud, A., and Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucl. Acids Res.* *29*, 3705–3727.
- Ranganathan, S., and Kern, P.A. (2002). The HIV protease inhibitor saquinavir impairs lipid metabolism and glucose transport in cultured adipocytes. *J. Endocrinol.* *172*, 155–162.
- Richman, D.D. (2001). Antiretroviral activity of emtricitabine, a potent nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Antivir. Ther. (Lond.)* *6*, 83–88.
- Richman, D.D., Margolis, D.M., Delaney, M., Greene, W.C., Hazuda, D., and Pomerantz, R.J. (2009). The challenge of finding a cure for HIV infection. *Science* *323*, 1304–1307.
- Rockstroh, J.K., Tepller, H., Zhao, J., Sklar, P., Miller, M.D., Harvey, C.M., Strohmaier, K.M., Leavitt, R.Y., and Nguyen, B.-Y.T. (2011). Clinical efficacy of raltegravir against B and non-B subtype HIV-1 in phase III clinical studies. *AIDS* *25*, 1365–1369.
- Roseninge, M.M., Gedela, K., Copas, A.J., Wilkinson, A., Sheehy, C.A., Bano, G., Hay, P.E., Pakianathan, M.R., and Sadiq, S.T. (2010). Tenofovir-linked hyperparathyroidism is independently associated with the presence of vitamin D deficiency. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *54*, 496–499.
- Rouzic, E.L., Bonnard, D., Chasset, S., Bruneau, J.-M., Chevreuril, F., Strat, F.L., Nguyen, J., Beauvoir, R., Amadori, C., Brias, J., *et al.* (2013). Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase-LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage. *Retrovirology* *10*, 144.
- Salzman, N.P., Psallidopoulos, M., Prewett, A.B., and O’Leary, R. (1993). Detection of HIV in bone allografts prepared from AIDS autopsy tissue. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 384–390.
- Sambrook, P., and Cooper, C. (2006). Osteoporosis. *Lancet* *367*, 2010–2018.
- Sanne, I., Piliero, P., Squires, K., Thiry, A., Schnittman, S., and AI424-007 Clinical Trial Group (2003). Results of a phase 2 clinical trial at 48 weeks (AI424-007): a dose-ranging, safety, and efficacy comparative trial of atazanavir at three doses in combination with didanosine and stavudine in antiretroviral-naïve subjects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* *32*, 18–29.
- Schacker, T. (2010). New tools to track HIV. *Nat Med* *16*, 373–374.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* *19*, 621–626.
- Scott, L., Carmona, S., and Stevens, W. (2009). Performance of the new Roche Cobas AmpliPrep-Cobas TaqMan version 2.0 human immunodeficiency virus type 1 assay. *J. Clin. Microbiol.* *47*, 3400–3402.
- Semenova, E.A., Marchand, C., and Pommier, Y. (2008). HIV-1 integrase inhibitors: update and perspectives. *Adv. Pharmacol* *56*, 199–228.

- Serrano, S., Mariñoso, M.L., Soriano, J.C., Rubiés-Prat, J., Aubia, J., Coll, J., Bosch, J., Del Rio, L., Vila, J., and Goday, A. (1995). Bone remodelling in human immunodeficiency virus-1-infected patients. A histomorphometric study. *Bone* 16, 185–191.
- Shankar, S.S., Dubé, M.P., Gorski, J.C., Klaunig, J.E., and Steinberg, H.O. (2005). Indinavir impairs endothelial function in healthy HIV-negative men. *Am. Heart J.* 150, 933.
- Sharkey, M.E., Teo, I., Greenough, T., Sharova, N., Luzuriaga, K., Sullivan, J.L., Bucy, R.P., Kostrikis, L.G., Haase, A., Veryard, C., *et al.* (2000). Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active anti-retroviral therapy. *Nat. Med.* 6, 76–81.
- Shirsat, N., Gokhale, A., Kunder, R., Goel, A., Sarin, R., Moiyadi, A., Shenoy, A., Mamidipally, C., Noronha, S., and Kannan, S. (2010). Distinctive microRNA signature of medulloblastomas associated with the WNT signaling pathway. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 6, 521.
- Sierra, S., Kupfer, B., and Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* 34, 233–244.
- Siliciano, J.D., Kajdas, J., Finzi, D., Quinn, T.C., Chadwick, K., Margolick, J.B., Kovacs, C., Gange, S.J., and Siliciano, R.F. (2003). Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med.* 9, 727–728.
- Skerlj, R., Bridger, G., McEachern, E., Harwig, C., Smith, C., Kaller, A., Veale, D., Yee, H., Skupinska, K., Wauthy, R., *et al.* (2011). Design of novel CXCR4 antagonists that are potent inhibitors of T-tropic (X4) HIV-1 replication. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 1414–1418.
- Song, I., Borland, J., Chen, S., Patel, P., Wajima, T., Peppercorn, A., and Piscitelli, S.C. (2012). Effect of food on the pharmacokinetics of the integrase inhibitor dolutegravir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1627–1629.
- Starcich, B.R., Hahn, B.H., Shaw, G.M., McNeely, P.D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E.S., Parks, W.P., Josephs, S.F., and Gallo, R.C. (1986). Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 45, 637–648.
- Steigbigel, R.T., Cooper, D.A., Kumar, P.N., Eron, J.E., Schechter, M., Markowitz, M., Loutfy, M.R., Lennox, J.L., Gatell, J.M., Rockstroh, J.K., *et al.* (2008). Raltegravir with optimized background therapy for resistant HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* 359, 339–354.
- Stellbrink, H.-J., Orkin, C., Arribas, J.R., Compston, J., Gerstoft, J., Van Wijngaerden, E., Lazzarin, A., Rizzardini, G., Sprenger, H.G., Lambert, J., *et al.* (2010). Comparison of changes in bone density and turnover with abacavir-lamivudine versus tenofovir-emtricitabine in HIV-infected adults: 48-week results from the ASSERT study. *Clin. Infect. Dis.* 51, 963–972.
- Stoye, J.P. (2012). Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. *Nat Rev Micro* 10, 395–406.
- Sugisaki, H., and Kanazawa, S. (1981). New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanoikoites* (FokI) and *Micrococcus luteus* (MluI). *Gene* 16, 73–78.

- Szcepek, M., Brondani, V., Büchel, J., Serrano, L., Segal, D.J., and Cathomen, T. (2007). Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* *25*, 786–793.
- Szybalski, W., Kim, S.C., Hasan, N., and Podhajski, A.J. (1991). Class-II restriction enzymes—a review. *Gene* *100*, 13–26.
- Tan, J., Wang, X., Devadas, K., Zhao, J., Zhang, P., and Hewlett, I. (2013). Some mechanisms of FLIP expression in inhibition of HIV-1 replication in Jurkat cells, CD4+ T cells and PBMCs. *J. Cell. Physiol.* *228*, 2305–2313.
- Tanaka, H., Arai, M., Tomoda, Y., Wada, T., Yago, K., and Satoh, M. (2013). Evaluation of renal adverse effects of combination anti-retroviral therapy including tenofovir in HIV-infected patients. *J Pharm Pharm Sci* *16*, 405–413.
- Tejerina, F., and Bernaldo de Quirós, J.C.L. (2011). Protease inhibitors as preferred initial regimen for antiretroviral-naïve HIV patients. *AIDS Rev* *13*, 227–233.
- Topper, M., Luo, Y., Zhadina, M., Mohammed, K., Smith, L., and Muesing, M.A. (2007). Posttranslational Acetylation of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase Carboxyl-Terminal Domain Is Dispensable for Viral Replication. *J. Virol.* *81*, 3012–3017.
- Väänänen, H.K., and Laitala-Leinonen, T. (2008). Osteoclast lineage and function. *Arch. Biochem. Biophys.* *473*, 132–138.
- Vanegas, M., Llano, M., Delgado, S., Thompson, D., Peretz, M., and Poeschla, E. (2005). Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering. *J Cell Sci* *118*, 1733–1743.
- Vasikaran, S., Eastell, R., Bruyère, O., Foldes, A.J., Garnero, P., Griesmacher, A., McClung, M., Morris, H.A., Silverman, S., Trenti, T., *et al.* (2011). Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int* *22*, 391–420.
- Van Vonderen, M.G.A., Lips, P., van Agtmael, M.A., Hassink, E.A.M., Brinkman, K., Geerlings, S.E., Sutinen, J., Ristola, M., Danner, S.A., and Reiss, P. (2009). First line zidovudine/lamivudine/lopinavir/ritonavir leads to greater bone loss compared to nevirapine/lopinavir/ritonavir. *AIDS* *23*, 1367–1376.
- Wah, D.A., Hirsch, J.A., Dorner, L.F., Schildkraut, I., and Aggarwal, A.K. (1997). Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA. *Nature* *388*, 97–100.
- Wah, D.A., Bitinaite, J., Schildkraut, I., and Aggarwal, A.K. (1998). Structure of FokI has implications for DNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 10564.
- Wayengera, M. (2011). Proviral HIV-genome-wide and pol-gene specific Zinc Finger Nucleases: Usability for targeted HIV gene therapy. *Theoretical Biology and Medical Modelling* *8*, 26.
- Wright, E.J. (2009). Neurological disease: the effects of HIV and antiretroviral therapy and the implications for early antiretroviral therapy initiation. *Curr Opin HIV AIDS* *4*, 447–452.

- Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W.A., and Sodroski, J.G. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* *393*, 705–711.
- Yi, J., Arthur, J.W., Dunbrack, R.L., and Skalka, A.M. (2000). An inhibitory monoclonal antibody binds at the turn of the helix-turn-helix motif in the N-terminal domain of HIV-1 integrase. *J. Biol. Chem* *275*, 38739–38748.
- Yonezawa, A., and Sugiura, Y. (1994). DNA binding mode of class-IIS restriction endonuclease FokI revealed by DNA footprinting analysis. *Biochim. Biophys. Acta* *1219*, 369–379.
- Zamborlini, A., Coiffic, A., Beauclair, G., Delelis, O., Paris, J., Koh, Y., Magne, F., Giron, M.-L., Tobaly-Tapiero, J., Deprez, E., *et al.* (2011). Impairment of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Integrase SUMOylation Correlates with an Early Replication Defect. *J. Biol. Chem.* *286*, 21013–21022.
- Zeldin, R.K., and Petruschke, R.A. (2004). Pharmacological and therapeutic properties of ritonavir-boosted protease inhibitor therapy in HIV-infected patients. *J. Antimicrob. Chemother.* *53*, 4–9.
- Zheng, R., Ghirlando, R., Lee, M.S., Mizuuchi, K., Krause, M., and Craigie, R. (2000). Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 8997–9002.
- Zheng, Y., Ao, Z., Wang, B., Jayappa, K.D., and Yao, X. (2011). Host Protein Ku70 Binds and Protects HIV-1 Integrase from Proteasomal Degradation and Is Required for HIV Replication. *J. Biol. Chem.* *286*, 17722–17735.
- Zhu, W., Jiao, Y., Lei, R., Hua, W., Wang, R., Ji, Y., Liu, Z., Wei, F., Zhang, T., Shi, X., *et al.* (2011). Rapid Turnover of 2-LTR HIV-1 DNA during Early Stage of Highly Active Antiretroviral Therapy. *PLoS ONE* *6*, e21081.