

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Biomediche

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale: 06/A3

Settore Scientifico disciplinare: MED/07

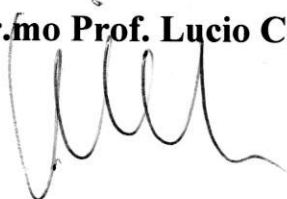
**STUDIO DELL'INTERAZIONE
DI HIV-1 SULLE CELLULE
PROGENITRICI EMATOPOIETICHE
CD34+ (HPC_s)**

Presentata da:

Dott.ssa Silvia Morini

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo Prof. Lucio Cocco



Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Carla Re



Esame finale anno 2014

INDICE

RELAZIONE FINALE	p. 4
1. INTRODUZIONE	p. 11
1.1. Tassonomia	p. 11
1.2. HIV	p. 13
1.2.1. Struttura	p. 13
1.2.2. Genoma e proteoma	p. 15
1.2.3. Proteine regolatrici ed accessorie	p. 16
1.2.4. Il ciclo replicativo di HIV	p. 18
1.2.5. Patogenesi dell'infezione da HIV	p. 22
1.2.6. Latenza virale	p. 26
1.2.7. Altri <i>reservoir</i> virali	p. 28
1.2.8. HIV e citopenie	p. 29
1.2.9. HIV e anemia	p. 30
1.3. Le cellule staminali	p. 33
1.4. Le cellule staminali ematopoietiche	p. 34
1.5. HIV e cellule progenitrici ematopoietiche CD34+	p. 38
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO	p. 42
3. MATERIALI E METODI	p. 44
3.1 Preparazione dello stock virale	p. 44
3.2 Separazione delle cellule progenitrici ematopoietiche CD34+	p. 44
3.3 Colture cellulari indifferenziate e trattamento virale	p. 45
3.4 Colture cellulari differenziate verso la linea eritroide e trattamento virale	p. 46
3.5 Analisi dell'apoptosi, del ciclo cellulare e dell'espressione della glicoforina A	p. 47
3.6 Analisi del DNA virale in cellule CD34+	p. 47
3.7 Analisi dell'mRNA delle cellule progenitrici ematopoietiche	p. 48
3.8 Coltura in terreno semi-solido di metilcellulosa	p. 49
3.9 Trasfezione delle HPCs e analisi del promotore del TGF- β 1 e IL-6	p. 50

3.10 Analisi statistiche	p. 53
4. RISULTATI	p. 54
4.1 Interazione tra HIV-1 e cellule progenitrici ematopoietiche (HPCs) Indifferenziate	p. 54
4.2 Interazione tra HIV-1 e cellule progenitrici ematopoietiche indotte in differenziamento verso la linea eritroide	p. 66
5. DUSCUSSIONE E CONCLUSIONI	p. 83
6. BIBLIOGRAFIA	p. 92

RELAZIONE FINALE

Titolo della tesi di Dottorato:

STUDIO DELL'INTERAZIONE DI HIV-1 SULLE CELLULE PROGENITRICI EMATOPOIETICHE CD34+ (HPCS)

La Dott.ssa Silvia Morini, nata a Bologna l' 08/03/1986, si è laureata il 14 dicembre 2010 in Biotecnologie Mediche presso l'Università degli Studi di Bologna, discutendo con la Prof.ssa Maria Carla Re e con il Prof. Davide Gibellini una tesi sperimentale dal titolo “Studio dell’espressione di IFI-16 nel compartimento linfoide”, con voto finale 110/110 e lode.

Nel Dicembre 2010 è risultata vincitrice del dottorato di ricerca in Scienze Biomediche presso l'Università di Bologna, in svolgimento da gennaio 2011 presso il Laboratorio Retrovirus del Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale (DIMES), U.O. Microbiologia, Policlinico S.Orsola-Malpighi.

In qualità di dottoranda ha appreso numerose tecniche, che spaziano dalla biologia molecolare (PCR, Real Time PCR qualitativa e quantitativa, sia a scopo diagnostico, per il follow up del paziente HIV-1 infetto, sia di ricerca, metodiche di Western Blot, Gel Shift Assay, clonaggio in vettori plasmidici, espressione di proteine in cellule procariotiche ed eucariotiche, test ELISA) alla biologia cellulare (colture di cellule primarie o di linee cellulari, trasfezione di DNA, crescita di cloni transienti, separazioni cellulari mediante selezione immunomagnetica positiva e negativa e citometria a flusso) e all’analisi morfologica (utilizzo della microscopia a fluorescenza nell’ambito di indagini immunocitochimiche).

La Dott.ssa Silvia Morini possiede solide basi di biologia molecolare e cellulare ed è dotata di autonomia scientifica. Assolve con costanza e impegno i compiti che le sono assegnati ed è sempre aperta alla collaborazione.

ATTIVITÀ DI RICERCA

La Dott.ssa Silvia Morini, durante i tre anni di dottorato svolti presso il Laboratorio Retrovirus del Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale (DIMES), U.O. Microbiologia, Policlinico S.Orsola-Malpighi si è concentrata su diverse linee di ricerca.

In particolare si è occupata da un lato dello studio dell'influenza del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) o sue proteine, come Tat e gp120, sul differenziamento delle cellule staminali mesenchimali ed ematopoietiche nei diversi *lineage* cellulari, e dall'altro si è concentrata sullo studio di nuove strategie terapeutiche. Infatti, oltre a testare diversi composti tesi a limitare o prevenire l'infezione, si è occupata della progettazione e produzione di una proteina chimerica, nata dalla fusione della proteina integrasi di HIV-1 con il sito endonucleasico di un enzima di restrizione, con la finalità di dis-integrare il genoma virale da quello cellulare. Questo rappresenta un approccio terapeutico del tutto innovativo che sfrutta i meccanismi propri del virus per combattere contro il virus stesso al fine di eradicare l'infezione.

RELAZIONE FINALE

Nella relazione finale la Dott.ssa Silvia Morini presenta e discute i risultati riguardanti gli effetti del virus HIV-1 a livello della cellula staminale ematopoietica CD34+ indifferenziata (HPCs) e durante il differenziamento verso la filiera eritrocitaria.

Oltre alla progressiva perdita dei linfociti T CD4, i pazienti HIV-infetti presentano diverse citopenie periferiche, che spesso rappresentano il primo sintomo che porta poi alla diagnosi di infezione.

L'anemia infatti si riscontra nel 10% dei pazienti asintomatici e nel 92% di quelli con AIDS e la terapia cART non è in grado di risolvere tale problematica.

I meccanismi patogenetici alla base di questa citopenia, seppur ancora ignoti, si ritiene che possano riguardare la deregolazione citochinica (in particolare di IL-

1 β , IFN- γ , TGF- β 1 e TNF α), il danno alle HPCs, alle cellule in differenziamento e alle cellule stromali.

Le cellule staminali ematopoietiche CD34+, dopo essere state separate da sangue cordonale mediante selezione immunomagnetica positiva e differenziate verso la linea eritroide mediante opportuni fattori differenziativi, sono state trattate con HIV-1 (attivo, inattivato al calore e gp120).

In prima istanza abbiamo indagato se tali cellule fossero suscettibili o meno all'infezione dal parte del virus, cosa alquanto controversa e dibattuta in letteratura. L'assenza del DNA integrato e provirale a livello delle HPCs ha mostrato la mancata suscettibilità all'infezione, nonostante la presenza del recettore CD4 e del corecettore CXCR4.

Abbiamo quindi analizzato l'effetto della glicoproteina di membra gp120 a livello della cellula indifferenziata e durante il differenziamento, mettendo in luce un aumento della percentuale di apoptosi, nel campione trattato con il virus, dovuto al legame gp120-CD4/CXCR4 e mediato dal TGF- β 1. Questo dato, concorde con altri studi già presenti in letteratura, è stato poi rafforzato dall'analisi di altri fattori, quali TNF α , CD34, GATA, risultati iper-espressi in seguito al trattamento con il virus.

L'aspetto innovativo di questo studio però si evidenzia esaminando l'effetto di gp120 durante il differenziamento verso la filiera eritrocitaria. Sono stati utilizzati due protocolli sperimentali: nel primo le cellule sono inizialmente trattate per 24 ore con gp120 (o con HIV-1 inattivato al calore) e poi indotte in differenziamento, nel secondo vengono prima differenziate e poi trattate con gp120.

L'utilizzo di protocolli diversi ha sorprendentemente mostrato risultati molto differenti. In particolari, il "priming" negativo con il virus ha messo in evidenza una apoptosi gp120- indotta molto marcata già dopo 48 ore dal trattamento ed una riduzione dell'espressione della glicoforina A, marker differenziativo eritroide.

Se tali cellule però, prima di essere trattate con gp120, vengono differenziate mediante apposite citochine, nei primi 5 giorni dal trattamento, è presente un aumento di proliferazione e differenziamento, a cui segue un brusco arresto che culmina con una apoptosi molto marcata (anch'essa dipendente dal legame gp120-

CD4 e CXCR4 e TGF- β 1 dipendente) e con una drastica riduzione del differenziamento.

In entrambi i casi e mediante meccanismi differenti, però, il risultato finale del contatto gp120-CD4/CXCR4 è la morte cellulare per apoptosi e la deregolazione del differenziamento che porta ad una riduzione del numero di globuli rossi.

Tale studio, sebbene non ancora concluso, ha una ricaduta importante dal punto di vista clinico poiché mette in luce l'esigenza di accompagnare la terapia tradizionale con Eritropoietina, al fine di arginare l'anemia che si presenta in corso di HIV.

In prospettiva questo studio si propone sicuramente non solo di indagare nel dettaglio i meccanismi alla base di tali citopenie, ma anche di valutare l'effetto dei farmaci antiretrovirali sulle HPCs e durante il loro differenziamento verso i vari lineage del sangue, e di determinare nuovi target ed approcci terapeutici.

Publicazioni e partecipazioni a Congressi

Publicazioni per esteso:

1. Gibellini D, Miserocchi A, Alviano F, Tazzari PL, Ricci F, Clò A, **Morini S**, Ponti C, Pagliaro P, Borderi M, Re MC: Analysis of HIV-1 Tat effects on survival and differentiation of vessel wall-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*
2. Gibellini D, Alviano F, Miserocchi A, Tazzari PL, Ricci F, Clò A, **Morini S**, Borderi M, Viale P, Pasquinelli G, et al.: HIV-1 and recombinant gp120 affect the survival and differentiation of human vessel wall-derived mesenchymal stem cells. *Retrovirology* 2011, 8:40.
3. Re MC, Bon I, Grandi N, Miserocchi A, **Morini S**, Clo A, Furlini G, Gibellini D, Recent and long-lasting infections: the need for avidity testing in HIV-1 infected subjects, *New Microbiol.* 2012 Oct;35(4):407-14. Epub 2012 Oct 1
4. Gibellini D, Borderi M, Clò A, **Morini S**, Miserocchi A, Bon I, Re MC:

- Antiretroviral molecules and cardiovascular diseases, *New Microbiol.* 2012 Oct; 35(4):359-75. Epub 2012 Oct 1. Review
5. D. Gibellini, M. Borderi, E. Vanino, A. Clò, **S. Morini**, L. Calza, M.C. Re, PI Viale, Molecular bases of osteoporosis in HIV: The role of the virus and antiretroviral therapy, *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* (2012)
 6. D. Gibellini, A. Clò, **S. Morini**, A. Miserocchi, C. Ponti and M. C. Re, “Effects of human immunodeficiency virus on the erythrocyte and megakaryocyte lineages,” *World Journal of Virology*, vol. 2, no. 2, p. 91, 2013.
 7. I. Bon, D. Lembo, M. Rusnati, A. Clò, **S. Morini**, A. Miserocchi, A. Bugatti, S. Grigolon, G. Musumeci, S. Landolfo, M. C. Re, and D. Gibellini, “Peptide-Derivatized SB105-A10 Dendrimer Inhibits the Infectivity of R5 and X4 HIV-1 Strains in Primary PBMCs and Cervicovaginal Histocultures,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, 2013.
 8. M. C. Re, I. Bon, N. Grandi, A. Miserocchi, **S. Morini**, A. Clò, G. Furlini, and D. Gibellini, “Recent and long-lasting infections: the need for avidity testing in HIV-1 infected subjects,” *New Microbiol.*, vol. 35, no. 4, pp. 407–414, Oct. 2012.
 9. I. Bon, M. Borderi, V. Colangeli, L. Calza, A. Clò, **S. Morini**, A. Miserocchi, M. Cricca, D. Gibellini, M.C. Re: 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, *International Journal of Infectious Diseases*, *International Journal of Infectious Diseases*, 2013
 10. D. Gibellini, M. Borderi, A. Clò, **S. Morini**, A. Miserocchi, I. Bon, C. Ponti, M.C. Re, HIV-1 related mechanisms in atherosclerosis and cardiovascular disease, *J Cardiovasc Med*, vol 14, pp 780-790, nov. 2013

Congressi:

1. G. Rossini, S. Morini, F. Cavrini, A.M. Pierro, P. Gaibani, N. Spataro, E. D'Angelo, M. Morara, M.P. Landini, V. Sambri: Chikungunya Virus (CHIKV) Infection: Analytical Performance of A Real-time PCR. Assay Suitable for Blood Screening (International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance 2009)
2. Bon I, Colangeli V, Calza L, Morini S, Clò A, Miserocchi A, Gibellini D, Re MC: Co-receptor R5 epidemiology in a HIV-1 experienced patients cohort and follow-up of the subset candidate for Maraviroc therapy. (39th SIM Congress, Riccione 3-6 ottobre 2011).
3. Miserocchi A, Morini S, Clò A, Bon I, Re MC, Gibellini D: HIV-1 Tat protein influences differentiative capability of human mesenchymal stem cells vessel wall-derived. (39th SIM Congress, Riccione 3-6 ottobre 2011).
4. S. Morini, A. Clò: Studio dell'interazione tra il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) e le cellule progenitrici, HIV-1 Junior Researchers Meeting, Borgo Artimino 13 aprile 2012.
5. S. Morini, A. Clò, A. Miserocchi, I. Bon, M. Borderi, F. Alviano, M.C. Re, D. Gibellini: HIV-1 viral proteins: a possible role in atherosclerotic lesions in HIV-infected patients (4° Italian conference on AIDS and Retroviruses, Napoli 10-12 giugno 2012).
6. Isabella Bon, Anna Miserocchi, Silvia Morini, Alberto Clò, Davide Gibellini, Leonardo Calza, Vincenzo Colangeli, Maria Carla Re: Fluctuation of V3 coreceptor tropism in HIV-1 infected patients under Maraviroc based therapy (4° Italian conference on AIDS and Retroviruses, Napoli 10-12 giugno 2012).
7. I. Vigliotta, S. Morini, A. Clò, A. Miserocchi, S. Guardiani, G. Musumeci, I. Bon, D. Gibellini e M.C. Re: HIV-1 and CD34+ haematopoietic progenitor cells interaction in the development and peripheral blood cytopenias (5° congresso nazionale SIVIM, Milano 28-30 novembre 2012).

8. N. Grandi, I. Bon, A. Clò, S. Morini, A. Miserocchi, D. Gibellini, MC. Re: La determinazione del tropismo virale su dna cellulare: utilizzo nella pratica clinica (40° congresso nazionale SIM, Riccione 7-10 ottobre 2012).
9. S. Morini, A. Clò, Verrucchi, L. Badia, D. Gibellini, M.C. Re, Caso clinico di Elite Suppressor, (HIV-1 Junior Researchers Meeting, Milano 21 marzo 2013).

1. INTRODUZIONE

HIV (Human Immunodeficiency Virus) è l'agente causale della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Diversi studi hanno permesso di individuare due principali ceppi di HIV: HIV-1 e HIV-2. HIV-1 è il ceppo più comune e ha una distribuzione mondiale, mentre il secondo ceppo, rappresentato da HIV-2, invece è presente soprattutto in Africa occidentale, nei Caraibi e nell'America meridionale [2].

Dal punto di vista epidemiologico l'infezione da HIV ad oggi interessa 35,3 milioni di persone nel Mondo, di cui 32,1 milioni sono adulti e 3,3 milioni sono bambini. In Italia, i dati del periodo compreso tra il 1985 ed il 2012 indicano 52629 nuove diagnosi di infezione. Il 72% dei soggetti infetti è di sesso maschile e il 23% di nazionalità straniera; ogni anno nel nostro paese dalle 3500 alle 4000 persone contraggono il virus [7].

1.1 Tassonomia

HIV è suddivisibile in due sottotipi: HIV-1 e HIV-2.

HIV-1 è di gran lunga il tipo più comune e ampiamente distribuito, che rappresenta la maggior parte dei casi di infezioni in tutto il Mondo. HIV-2 ha una significativa prevalenza nell' Africa occidentale e centrale, nell'India meridionale e occidentale, anche se eventi sporadici di trasmissione sono stati segnalati in molti paesi, tra cui gli Stati Uniti d'America (USA), Europa e Australia [25-26-27-28-29].

Le differenze tra i tipi di HIV 1 e 2 riflettono il loro origini zoonotiche. In particolare HIV-1 è più simile ai ceppi SIV isolati da *Scimpanzé* e HIV-2 a quelli isolati da *Sooty Mangabey*. Vi è inoltre evidenza che l'HIV-2 causi una infezione meno virulenta, con cariche virali generalmente più basse, minor tasso di trasmissione verticale e più lenta progressione della malattia [2-30-31].

Solo il 40% delle sequenze di HIV-1 e HIV-2 sono identiche. Sulla base delle sequenze del gene env sono stati identificati nove sottogruppi di HIV-1 (A-I) e 5 di HIV-2 (A-E).

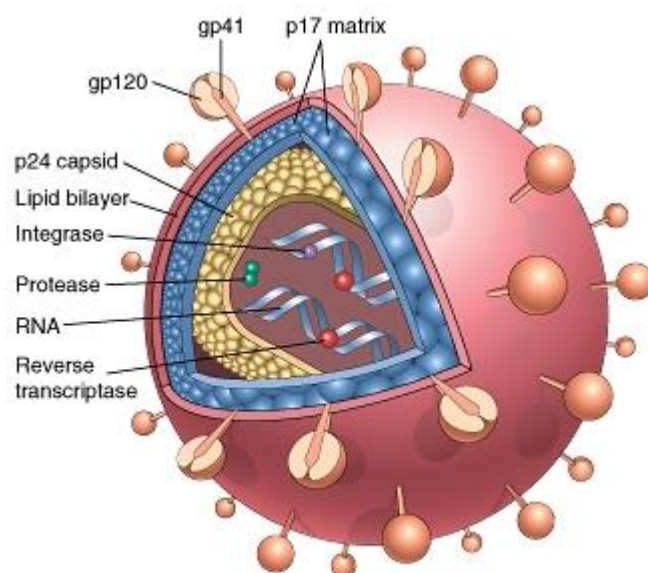
1.2 Human Immunodeficiency Virus (HIV)

I virus della famiglia Retroviridae sono classificati in due sottofamiglie: Orthoretrovirinae e Spumaretrovirinae. Tra gli Orthoretrovirinae troviamo gli Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon-retrovirus ed i Lentivirus.

HIV appartiene alla famiglia Retroviridae, sottofamiglia Lentivirinae, genere Lentivirus.

1.2.1 Struttura

Il genoma di HIV presenta due molecole identiche di RNA a polarità positiva, di circa 9,7 kilobasi. Ciascun filamento di RNA possiede inoltre nove geni virali. L'RNA è racchiuso all'interno di un *capside*, formato da circa 2000 copie della proteina virale p24. All'esterno del capsid è presente l'*envelope* virale, il quale è costituito da un doppio strato lipidico, formatosi dalla membrana della cellula ospite, durante la fuoriuscita (*budding*) della particella virale neoprodotta (**Figura 1**).



Copyright © 2002, Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura virale.

Ciascuna subunità dell'*envelope* è formata da due proteine di membrana: la glicoproteina 120 (gp120), ovvero quella più esterna, e gp41, la proteina transmembrana che ancora il complesso glicoproteico alla superficie del virione.

Le proteine dell'*envelope* sono le componenti più variabili di HIV; infatti gp120 presenta al suo interno regioni variabili (V1-V4) e regioni costanti (C).

La variabilità della regione V può essere un prodotto della funzionalità dell'*envelope*, come è stato descritto per la regione V3, dove le variazioni aminoacidiche a livello di questa regione, determinano il tipo di corecettore utilizzato. La variabilità dell'*envelope* di HIV conferisce inoltre unicità al complesso antigenico [2].

L'organizzazione genomica di HIV è estremamente efficiente. Sono presenti nove geni che codificano proteine con funzione strutturale, catalitica, regolatoria ed accessoria. Oltre alle funzioni di tali proteine durante il ciclo virale, la sequenza nucleotidica virale possiede funzioni intrinseche. Ad esempio, l'elemento reattivo Rev, all'interno della regione codificante per gp41, interagisce con la proteina Rev per assistere l'esportazione degli RNA trascritti dal nucleo della cellula. Inoltre la regione LTR (*long terminal repeat*) ha la funzione di promuovere la trascrizione a livello del DNA provirale integrato e contiene regioni essenziali per la retro-trascrizione, integrazione nel genoma della cellula ospite e dimerizzazione dell'RNA genomico.

Le due molecole di RNA sono inoltre poliadenilate all'estremità 3' e mantenute insieme, a livello delle estremità 5', in un dimero speculare. La molecola di RNA genomico, a circa un centinaio di nucleotidi dall'estremità 5', è appaiata con una piccola molecola di RNA di origine cellulare, costituita da una molecola di RNA-transfer, la cui funzione è quella di servire da innesco per l'enzima trascrittasi inversa [1].

Ciascuna molecola di RNA genomico inoltre presenta, agli estremi, due sequenze nucleotidiche peculiari, rappresentate dalle sequenze LTR (*long terminal repeat*). Tali sequenze sono costituite da 3 regioni: la più esterna è ripetuta ai due estremi (sequenze R), mentre quella più interna è caratteristica rispettivamente dell'estremo 5' (sequenza U5) e dell'estremo 3' (sequenza U3). Le sequenze U5

ed U3 sono retro-trascritte ad ambedue gli estremi della molecola di DNA provirale che risulta, di conseguenza, più lunga della molecola di RNA genomico. L'insieme U3-R-U5, presente ad ogni estremo del DNA provirale, forma il segmento LTR, che contiene sia il *promoter* sia l'*enhancer* necessari alla trascrizione del provirus [1].

1.2.2 Il genoma e il proteoma

Il genoma di HIV è formato dalla successione di tre geni principali: *gag*, *pol* ed *env*. Il gene *gag* codifica le proteine strutturali del core (capsidiche e nucleocapsidiche) virale, il gene *pol* codifica le proteine enzimatiche virali (trascrittasi inversa, proteasi ed integrasi) ed il gene *env* codifica le proteine che una volta glicosilate formeranno le glicoproteine virus-specifiche dell'envelope virale.

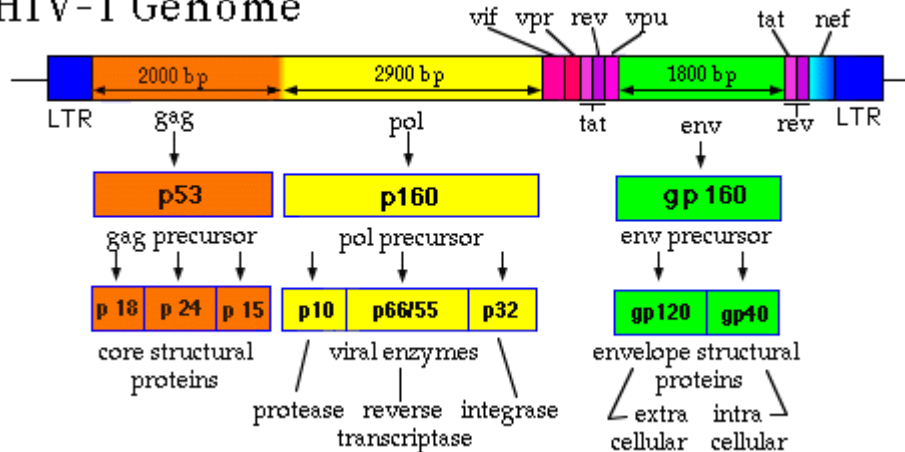
Il genoma di HIV, oltre ai geni *gag*, *pol* ed *env*, codifica altri sei geni, i cui prodotti hanno funzioni regolatorie ed accessorie nel ciclo replicativo virale.

I geni *gag*, *pol* ed *env* sono tradotti in poliproteine, le quali vengono poi scisse nelle proteine funzionali definitive, che si assemblano, insieme alle due molecole di RNA genomico, nel virione completo.

I geni *gag-pol* sono co-tradotti inizialmente in una poliproteina di 180 kd (p180) che viene poi scissa in una proteina di 55 kd (p55) e negli enzimi virus specifici: proteasi, trascrittasi inversa ed integrasi. La proteina p55 a sua volta viene scissa in tre proteine: p17 (di 17 kd), p24 (di 24 kd) e p9 (9 kd). La proteina p17 rappresenta la matrice virale, p24 forma il capside virale, mentre p9 si lega alle molecole di RNA (**Figura 2**).

Il gene *env* è tradotto inizialmente in una poliproteina (p88) che viene successivamente glicosilata (gp160) e quindi scissa in due glicoproteina gp41 e gp120, di cui la prima è inserita attraverso l'involucro pericapsidico, mentre l'altra è esposta sulla superficie del virione [1].

HIV-1 Genome



ccz/95

Figura 2: Rappresentazione delle diverse proteine codificate dal genoma di HIV [117].

1.2.3 Proteine regolatrici ed accessorie

Il genoma di HIV, oltre ai geni gag, pol ed env, contiene altre sei sequenze che codificano altrettante proteine le quali svolgono funzioni regolatrici o accessorie nel ciclo di replicazione virale. Tali proteine prendono il nome di Tat, Rev, Vpu, Nef, Vif e Vpr.

La proteina Tat è una proteina di 14 kd che, una volta sintetizzata, rientra nel nucleo cellulare e svolge la funzione di transattivatore della trascrizione del genoma provirale. Essa infatti rappresenta un elemento del complesso trascrizionale del provirus di HIV e non solo sembra favorire il reclutamento dei fattori trascrizionali attivati a livello del promotore, ma lega anche alcuni adattatori trascrizionali, costituiti da diverse proteine, tra cui p300 e una o più proteine CBP, che possiedono un'attività acetiltraferasica nei confronti degli istoni della cromatina, favorendo la trascrizione del DNA.

La proteina Rev è una proteina di 19 kd che svolge una funzione importante nel regolare la produzione degli RNA virus-specifici e protegge gli mRNA dalla elaborazione ad opera degli appositi organuli nucleari.

La proteina Vpu è una proteina di 16 kd che ha la funzione di facilitare il trasporto del prodotto del gene env verso la membrana cellulare, mentre la proteina Nef, di

27 kd, ha la funzione di favorire la replicazione e l'infettività virale. Essa ostacola infatti l'attività dei linfociti T citotossici e facilita la trascrizione del genoma virale.

La proteina Vif è una proteina di 23 kd che influisce sulla capacità del virus di dar luogo ad un ciclo completo di replicazione virale con produzione di una progenie virale infettante. La sua azione sembra consistere nel legarsi ad una citosina deaminasi (APOBEC3G) favorendone la degradazione attraverso il sistema ubiquitino-dipendente.

La proteina Vpr, infine, è una proteina di 14 kd che ricopre un ruolo importante nel favorire il trasporto intranucleare del complesso nucleoproteico virale che provvederà alla successiva integrazione del provirus nel genoma della cellula ospite [1].

1.2.4 Il ciclo replicativo di HIV

Il ciclo replicativo di HIV prevede diverse fasi, le quali sono rappresentate dal legame e dall'ingresso del virus nella cellula ospite, dalla formazione del complesso di pre-integrazione, dall'integrazione, trascrizione ed infine assemblaggio dei virioni, con fuoriuscita della progenie neoprodotta (**Figura 4**).

Legame ed ingresso virale

L'infezione della cellula ospite inizia nel momento in cui HIV si lega a specifici recettori presenti sulla membrana cellulare. In generale, l'interazione virus-cellula richiede il riconoscimento, da parte della proteina gp120 virale, di due proteine recettoriali presenti sulla superficie della cellula ospite. La presenza o l'assenza di tali proteine sulla superficie cellulare limita la gamma di cellule suscettibili all'infezione da parte di HIV.

Il primo recettore cellulare identificato, specifico per HIV, è stato la molecola CD4, presente sulla superficie dei linfociti T helper, e che funziona da ligando specifico per le molecole MHC di classe II, durante i processi di interazione cellulare legate al riconoscimento dell'antigene [8-9]. La molecola CD4 non è presente unicamente a livello dei linfociti T helper, ma anche sulla superficie di una notevole percentuale dei monociti presenti nel sangue circolante, nei macrofagi tissutali, nelle cellule dendritiche follicolari dei linfonodi, nelle cellule della microglia dell'encefalo e nelle cellule dendritiche della cute e mucose. Non c'è dubbio che il CD4 sia il recettore fondamentale, per il quale la glicoproteina gp120 presente nell'envelope virale presenta un'elevatissima affinità e con il quale gp120 interagisce.

Tuttavia, oltre al CD4, è necessaria la presenza di corecettori per consentire l'ingresso del virus. Questa funzione può essere svolta da una serie di proteine appartenenti alla classe dei recettori con sette domini transmembrana, anche se le più importanti sono rappresentate dalle molecole CCR5 e CXCR4 [10-11]. La classe di tali recettori è molto vasta e contiene oltre 100 proteine correlate. Molte

di queste proteine hanno dimostrato facilitare il legame di HIV in vitro. Il significato in vivo dell'ingresso virale attraverso questi co-recettori minori, tuttavia, rimane poco chiaro. In particolare sulla superficie dei macrofagi è presente il corecettore CCR5, mentre i ceppi linfotropi usano il CXCR4 (recettore per la chemochina SDF-1).

L'infezione inizia con l'ancoraggio del virione alla membrana della cellula bersaglio. Questo processo comincia con il legame della glicoproteina pericapsidica env (3 molecole di gp120 e gp41) con il CD4 presente sulla superficie cellulare. Questo legame provoca l'esposizione di un'altra porzione del trimero env che interagisce con il corecettore CXCR4, nel caso degli stipiti linfotropici di HIV, o con il CCR5, nel caso degli stipiti monotropici. Esiste anche un certo numero di stipiti duo-tropici, in grado di infettare sia cellule linfocitarie che macrofagiche CD4. In particolare il legame di gp120 di HIV al recettore CD4 e al co-recettore, determina un cambiamento conformazionale a livello di gp41 che provoca l'inserimento della regione peptidica di fusione all'N-terminale nella membrana della cellula ospite (**Figura 3**) [12-13-14-15-16]. Tale inserimento comporta la fusione delle membrane e l'ingresso del virus nel citoplasma, un processo criticamente dipendente dalle interazioni tra le regioni N - e C - terminali di gp41 [2 e 3].

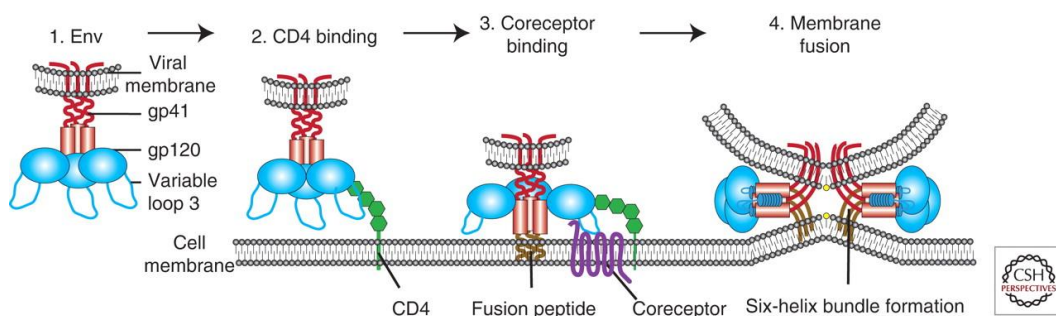


Figura 3: Rappresentazione delle fasi dell'ingresso virale [3].

La liberazione del nucleocapside virale nel citoplasma cellulare avviene per la fusione del peploma virale con la membrana cellulare esterna.

Formazione del complesso di pre-integrazione

L'informazione genomica di HIV è contenuta nel genoma ad RNA. Durante l'infezione della cellula ospite, il genoma a RNA è prima retro trascritto a DNA a singolo filamento, che viene poi convertito in DNA a doppio filamento [17-18]. Il genoma a DNA a doppio filamento forma un complesso con proteine virali e cellulari che viene attivamente trasportato al nucleo [1].

Integrazione, trascrizione e assemblaggio dei virioni

Il genoma a DNA a doppio filamento viene quindi integrato, mediante l'enzima virale integrasi, nel DNA cromosomico della cellula ospite. Il DNA virale integrato o provirus può rimanere silente per periodi di tempo anche molto lunghi prima di essere trascritto nei diversi RNA messaggeri e dare l'avvio ad un ciclo di replicazione virale (infezione produttiva).

Il provirus è caratterizzato dalla presenza di copie identiche dell'LTR che fiancheggiano le regioni codificanti. Il 5' dell'LTR ora funziona come promotore, regolando la produzione dei trascritti di RNA, i quali sono anche regolati dai fattori trascrizionali della cellula ospite e dalla proteina virale Tat [19-20-21].

All'inizio del processo di trascrizione, gli mRNA virali che vengono esportati nel citoplasma sono di piccole dimensioni e corrispondono in pratica ai singoli geni che codificano le proteine regolatrice ed accessorie. La proteina Tat è una delle proteine che devono essere codificate all'inizio del ciclo replicativo, poiché gioca un ruolo chiave in questo processo. Essa infatti rientra nel nucleo ed è essenziale affinché il processo di trascrizione del provirus avvenga regolarmente. Anche la proteina Rev rientra nel nucleo, dove si lega agli RNA messaggeri virali e li protegge dall'azione degli spliceosomi nucleari, consentendo l'esportazione nel citoplasma degli RNA messaggeri di maggiori dimensioni, corrispondenti

all'intera sequenza provirale. Essi in parte vengono tradotti nelle poliproteine da cui prendono origine le diverse proteine strutturali e in parte vanno a costituire il genoma dei virioni neoprodotti che a questo punto si assemblano, acquisendo l'involucro pericapsidico e liberandosi per gemmazione nell'ambiente extracellulare [1-2-22-23-24].

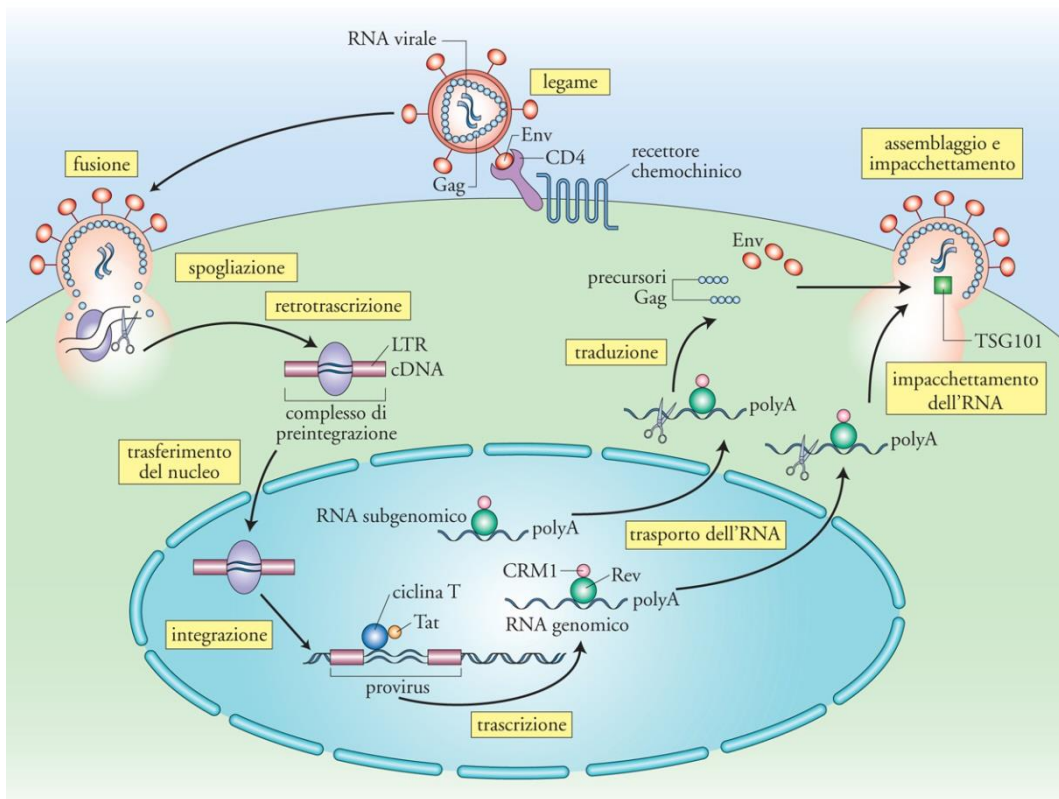


Figura 4: Ciclo replicativo di HIV-1 [116].

1.2.5 Patogenesi dell'infezione da HIV

L'infezione da HIV-1 rappresenta la tappa iniziale di un processo che, dopo un periodo di tempo piuttosto lungo di latenza clinica (oggi notevolmente prolungabile grazie alla presenza dei farmaci antiretrovirali) si traduce inesorabilmente con la morte del paziente.

L'infezione primaria comprende il periodo di tempo che va dal momento dell'infezione iniziale allo sviluppo di una reazione anticorpale evidenziabile con i test di routine diagnostica (sierconversione). Al termine dell'infezione acuta si stabilisce un equilibrio tra la replicazione virale e la risposta immune dell'ospite, che viene definita fase cronica, durante la quale non sono presenti sintomi caratteristici. Nell'ultimo stadio dell'infezione, ovvero lo stadio di AIDS conclamato, si assiste al calo drastico dei linfociti CD4, all'aumento della viremia e all'insorgenza di infezioni opportunistiche che portano al decesso del paziente.

Infezione primaria

Dopo l'esposizione delle mucose al virus, HIV-1 sembra infettare inizialmente le cellule mucosali del Langerhans. Queste cellule possiedono lunghi processi che si interdigitano tra le cellule epiteliali e sub-epiteliali. Tali cellule macrofagiche sono fondamentali per la presentazione degli antigeni e per attirare le cellule T CD4+. Esse esprimono il CD4 ed il CCR5, anche se solo debolmente, e quindi sono infettabili da parte di HIV. Tali cellule del Langerhans inoltre esprimono anche una lectina a livello della superficie cellulare, nota come DC-SIGN, che è capace di legare gp120 con alta affinità. Il virus vincolato alle cellule mucosali di Langerhans viene quindi allontanato dalla mucosa per essere portato in prossimità delle cellule T CD4+ .

Il virus è quindi in grado di infettare le cellule T CD4 esprimenti il corecettore CCR5, le quali migreranno poi verso i linfonodi regionali. Le cellule T infettate rimangono dunque sequestrate nei linfonodi regionali fino al raggiungimento di

una soglia di replica per 2-6 settimane, in seguito si verifica una forte viremia plasmatica. Questa è definita infezione primaria da HIV.

Dopo l'infezione primaria, il virus diffonde in pochi giorni in tutti i distretti del corpo. Questa fase è associata ad una carica virale plasmatica molto elevata, e livelli di RNA virale possono superare le 5×10^6 copie di RNA/ml .

Questa fase, spesso asintomatica, può talvolta essere accompagnata da sintomi aspecifici, quali eruzione cutanea, linfadenopatia, artropatia e febbre. Il picco viremico si risolve spontaneamente dopo 2-4 settimane, in seguito alla risposta immunitaria primaria. Anche se la viremia plasmatica è soppressa dopo la sierconversione, HIV-1 non viene mai eliminato dall'organismo. Il picco di viremia è associato ad una riduzione transitoria delle cellule T CD4 + nel sangue periferico. Questo è generalmente modesto e di breve durata, ma può occasionalmente portare ad una immunosoppressione clinica del paziente.

Una volta che il picco di viremia è stato risolto, i livelli di cellule CD4+ ritornano ai livelli basali, ma rimangono inferiori a quelli pre-infezione [33-34-35-36].

Latenza clinica

Durante la fase asintomatica cronica di HIV, i linfociti CD4 diminuiscono lentamente e in modo lineare. I livelli di RNA sono molto variabili tra gli individui (possono variare da < 50 copie di RNA/ml, nel caso degli *elite controllers*, a $> 1.000.000$ copie RNA/ml). Però il DNA provirale è sempre rilevabile nei PBMC.

L'uso di farmaci anti-retrovirali conduce alla soppressione della replicazione virale, ad una riduzione della viremia plasmatica ed un aumento della conta CD4 [37-38-39] .

Fase terminale di infezione

La diminuzione della conta dei CD4 nel corso di HIV-1 non è costante nel tempo. C'è una rapidissima e temporanea diminuzione di cellule T CD4+ durante l'

infezione primaria, a cui segue una fase asintomatica in cui il calo della conta dei CD4 è variabile e legato principalmente al livello di viremia. Tuttavia, il calo in questa fase sembra essere approssimativamente lineare, e quindi costante nel tempo. Nelle fasi precoci della malattia il virus sembra utilizzare preferenzialmente il CCR5, mentre nella fase cronica il virus pare utilizzi il CXCR4 come co-recettore, o abbia il doppio tropismo sia per il CCR5 sia per il CXCR4. Il CCR5 è espresso principalmente su linfociti T attivati e macrofagi, e non è altamente espresso sulle cellule *T-resting*. Questo in parte spiega l'associazione tra l'attivazione delle cellule T e suscettibilità a HIV-1 in vitro. Il CXCR4 è più ampiamente espresso a livello delle cellule immunitarie sia *resting* sia attivate. La differenza tra l'utilizzo del recettore CCR5 e del CXCR4 è stato dimostrato risiedere in 2 sostituzioni aminoacidiche a livello del loop V3 di gp120.

Il ruolo critico del co-recettore CCR5 nel definire l'ingresso di HIV-1 nelle cellule T attivate può essere dimostrata attraverso lo studio dei polimorfismi CCR5. E' stata descritta una mutazione per delezione di 32 paia di basi del CCR5, $\Delta - 32$, in cui il corecettore viene sintetizzato ma non è in grado di essere espresso sulla membrana cellulare. I soggetti che sono omozigoti per la mutazione $\Delta-32$ sembrano essere immunologicamente normali, ma meno suscettibili all'infezione. Circa l'1 % della popolazione caucasica è omozigote per questa mutazione, e il 17 % eterozigote. Gli individui eterozigoti per $\Delta-32$ sviluppano una patologia caratterizzata da un tasso più lento di declino CD4, e quindi da una prognosi migliore [6-60-41-42].

La fase cronica, in cui è presente la progressiva perdita dei linfociti T CD4, culminano poi con la fase terminale, o AIDS conclamato, in cui la compromissione immunologica è drammatica, la viremia è molto alta e si arriva al decesso del paziente (**Figura 5**).

The typical clinical course of HIV disease.

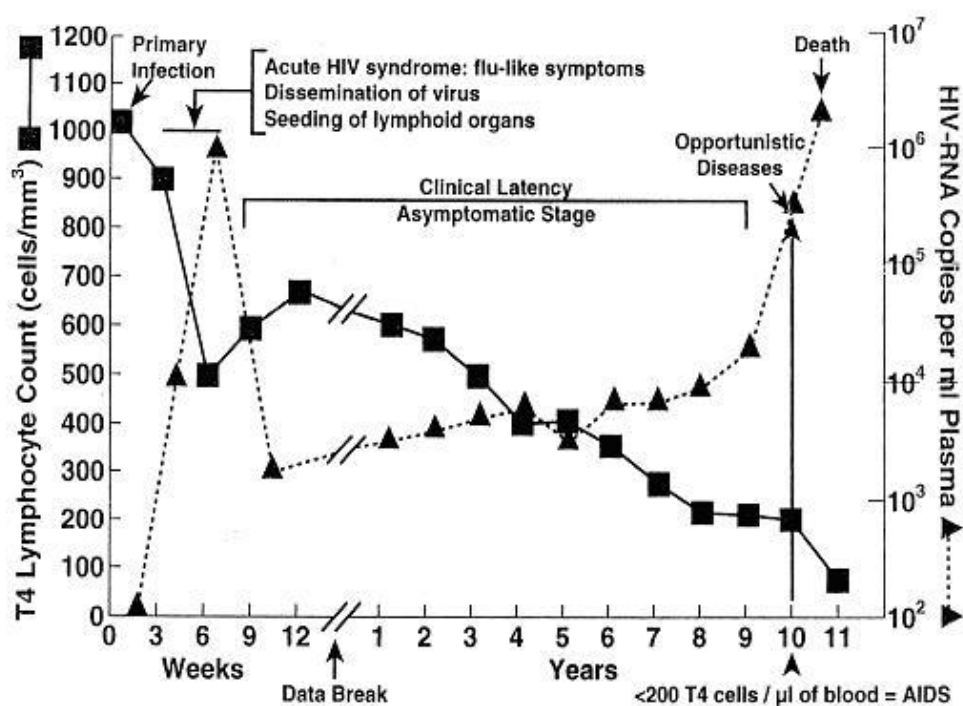


Figura 5: Conta dei linfociti CD4 (cellule/mm³) e viremia plasmatica (copie RNA/ml) durante l'infezione da HIV [6].

1.2.6 Latenza virale

La latenza virale è uno stato di reversibile infezione non produttiva delle singole cellule. Diversi Herpesvirus hanno programmi genetici elaborati che consentono la persistenza dei genomi virali con l'espressione genica virale minima. Per i retrovirus, l'integrazione stabile del cDNA virale nel cromosoma della cellula ospite, è un passo essenziale che permette la persistenza dei genomi virali per la durata della vita delle cellule infette .

Per HIV-1, il termine latenza è stato inizialmente utilizzato nel senso clinico, per descrivere il lungo periodo asintomatico tra l'infezione iniziale e lo sviluppo di AIDS. Tuttavia, con l'avvento di sensibili saggi di RT-PCR per valutare la viremia [43], è diventato chiaro che il virus replichi attivamente durante tutto il corso dell'infezione, anche durante il periodo asintomatico.

Il meccanismo principale attraverso il quale HIV-1 elude la risposte immunitaria non è la latenza, ma piuttosto la rapida evoluzione di mutazioni che annullano il riconoscimento da parte degli anticorpi neutralizzanti e dei linfociti T citotossici [44] .

È interessante notare che HIV-1 non stabilisce in modo efficiente una infezione produttiva in cellule quiescenti T CD4+ [45-46-47]. Ma come può svilupparsi un'infezione latente in queste cellule *resting*? Un'ipotesi plausibile è basata sulla normale fisiologia delle cellule T CD4+. In risposta all'antigene, tali cellule *resting* subiscono eventi di proliferazione e differenziamento cellulare, che danno origine a cellule effettrici

La maggior parte delle cellule effettrici muore rapidamente, ma un sottoinsieme sopravvive e ritorna ad uno stato di quiescenza in G₀. Esse persistono come cellule di memoria, con un modello alterato di espressione genica. Le cellule T CD4 attivate, sono altamente suscettibili all'infezione da parte di HIV-1 e tipicamente muoiono rapidamente a causa dell'effetto citopatico del virus o delle risposte immunitarie dell'ospite [48-49]. Tuttavia, alcune cellule T CD4 + attivate possono infettarsi e quindi sopravvivere abbastanza a lungo per ripristinare uno stato quiescenza.

Poiché l'espressione genica di HIV-1 dipende da fattori di trascrizione inducibili da parte dell'ospite, che vengono attivati solo transitoriamente dopo l'esposizione all'antigene, l'espressione genica virale può essere estinta come le cellule ritornano ad uno stato di memoria.

Il risultato è una forma stabilmente integrata ma trascrizionalmente silente del virus a livello cellulare, la cui funzione è di sopravvivere per lunghi periodi di tempo. Nello stato latente, il virus persiste semplicemente come informazione (sotto forma di 10 kb di integrato HIV-1 DNA), ed è quindi influenzato da farmaci antiretrovirali o dalle risposte immunitarie. Tuttavia, se la cellula ospite viene riattivata da un incontro con l'antigene o di altri stimoli attivanti, la latenza può essere revertita e la cellula può iniziare a produrre attivamente particelle virali.

L'introduzione di combinazioni di farmaci antiretrovirali noti come terapia antiretrovirale altamente attiva, o HAART, ha dimostrato ridurre i livelli di virus nel plasma al di sotto del limite di rilevazione, sollevando speranze per l'eradicazione virale [50-51-52]. Il quesito a cui si è poi cercato di dare una risposta è se il pool di cellule latentemente infette si mantiene o meno nei pazienti che hanno soppresso la viremia a livelli non rilevabili, grazie alla terapia antiretrovirale. La risposta a questa domanda è stata data contemporaneamente da tre gruppi, che hanno dimostrato nel 1997 che le cellule latentemente infette persistono nei pazienti che rispondono bene alla HAART [53-54-55] .

1.2.7 Altri *reservoir* virali

Fin dalla descrizione delle cellule T CD4 come *reservoir* di infezione, diversi tipi cellulari e siti anatomici sono stati proposti come ulteriori *reservoir*.

I *reservoir* virali sono tipi cellulari o siti anatomici in cui il virus persiste in forma latente per lunghi periodi di tempo, anche in pazienti sottoposti a terapia HAART efficace. In pratica rappresentano delle barriere all'eradicazione.

In molti pazienti sottoposti ad HAART, la viremia, dopo un momento iniziale in cui è molto elevata, si abbassa e rimane a livelli al di sotto dei limiti di rilevanza delle metodiche di diagnostica (50 copie/ml) per periodi di tempo indefiniti (viremia residua).

In alcuni pazienti, tuttavia, la viremia residua è dominata da un piccolo numero di cloni virali che non sono ben rappresentati nelle cellule T CD4 + circolanti [56]. Inoltre, l'analisi di sequenze virali in cellule T CD4 + a riposo e nella viremia residua con metodi filogenetici ha rivelato che alcuni virus nel plasma rappresentano una popolazione distinta non presente in cellule T CD4 + a riposo [57-58]. Questi studi suggeriscono che siano presenti ulteriori fonti di viremia residua nei pazienti trattati con HAART oltre ai *reservoir* rappresentati dalle cellule T CD4+. Le cellule della linea dei monocito-macrofagica sono chiaramente infettate da HIV-1 [59-60]. I macrofagi infetti possono costituire una fonte particolarmente importante di virus durante il decorso della malattia, quando le cellule CD4+ sono estremamente ridotte. Esistono alcune prove per l'infezione dei monociti circolanti [61-62], anche se tali cellule non possono essere considerate un serbatoio di infezione, poiché circolano solo per circa 1 giorno prima di entrare nei tessuti e differenziarsi in macrofagi. I monociti possono attraversare la barriera ematoencefalica e differenziarsi in macrofagi e cellule microgliali. Pertanto, l'infezione dei monociti può fornire un meccanismo per l'ingresso del virus nel sistema nervoso centrale [63]. E' ancora controverso e dibattuto se le cellule progenitrici del lineage monocito-macrofagico o se le cellule staminali ematopoietiche (HSC) siano infettate o meno in vivo.

Questa problematica è attualmente ancora molto dibattuta e sono molteplici gli studi in atto [64]. Rimane ancora poco chiara la misura in cui queste cellule sopravvivono nei pazienti in HAART.

1.2.8 HIV e citopenie

L'infezione da HIV, oltre ad essere caratterizzata dalla progressiva compromissione del sistema immunitario ed alla perdita dei linfociti T CD4+, comporta anche disfunzioni a livello di altre cellule e tessuti. In particolare sappiamo compromettere l'osso, portando osteopenia ed osteoporosi, in soggetti giovani, ma anche il sistema cardiovascolare e renale [65-66-67]. Anche il sistema nervoso centrale è soggetto al danno da parte del virus, infatti sono parecchi i casi di demenza HIV-indotta e di danni neuronali.

Oltre alla perdita dei linfociti CD4, i pazienti HIV infetti presentano numerose citopenie a livello del sangue periferico. In particolare la trombocitopenia rappresenta una delle prime manifestazioni ematologiche, mentre anemia e neutropenia si manifestano nelle fasi più tardive dell'infezione [68-69-70-71-72].

Queste citopenie del sangue periferico sono state osservate anche in assenza di tumori, trattamento chemioterapico o infezioni opportunistiche, quindi l'infezione da HIV può essere direttamente associata all'induzione di queste anomalie ematologiche. Il progressivo esaurimento di queste linee cellulari del sangue è stato correlato a diversi meccanismi HIV-relati, come la riduzione della sopravvivenza e proliferazione delle cellule progenitrici ematopoietiche (HPC), l'inibizione della differenziazione delle cellule progenitrici in determinate linee cellulari o l'azione diretta sulle cellule mature; il deterioramento delle cellule stromali, e la deregolazione della produzione di citochine e la comparsa di reazioni autoimmuni.

1.2.9 HIV e anemia

L'anemia è una complicanza clinica rilevabile in molti pazienti affetti da HIV [73]. L'incidenza complessiva di anemia nei soggetti HIV-positivi è del 10 % in pazienti asintomatici e fino al 92 % nei pazienti con AIDS. Il trattamento con cART ha ridotto il problema dell'anemia nei pazienti affetti da HIV ma non lo ha risolto completamente. In una coorte di 1624 pazienti nello studio EuroSIDA, la prevalenza di anemia durante HAART è scesa dal 65 % nei pazienti naive al 53 % dopo 6 mesi di terapia e il 45 % dopo 1 anno di terapia [74]. Anche se l'anemia generalmente non crea morte nei pazienti HIV, è ben noto che possa aumentare la morbilità in questi soggetti. I pazienti affetti da HIV con anemia presentano un più alto rischio di ridotta sopravvivenza rispetto a quelli non anemici. I sintomi dell'anemia durante l'infezione da HIV non sono diversi dai sintomi che si osservano nei pazienti HIV negativi, e la diagnosi è spesso una diagnosi di laboratorio basata su una riduzione del valore di emoglobina (Hb) e sulla conta degli eritrociti. L'anemia è generalmente mite con concentrazioni di Hb comprese tra 8-14 g / dL per gli uomini e 8-12 g / dL per le donne, anche se il grado di anemia dipende dal contesto immunosoppressivo e dallo stadio della malattia. La morfologia eritrocitaria non presenta variazioni consistenti a livello del sangue periferico.

La patogenesi dell'anemia nei pazienti HIV-positivi è multifattoriale: i diversi meccanismi che sono coinvolti nell'induzione dell'anemia coinvolgono la riduzione della produzione degli eritrociti e l'aumento della loro distruzione. L'HIV è direttamente coinvolto nell'induzione dell'anemia, anche se sono implicate altre cause nella comparsa dell'anemia, come le malattie neoplastiche, le carenze vitaminiche, la compromissione del metabolismo del ferro, i trattamenti farmacologici e le infezioni opportunistiche. Cleveland e colleghi hanno osservato l'espressione del CD4 sulle membrane cellulari delle cellule eritroidi differenziazione. La coespressione di CD4 e glicoforina A indica che alcune cellule in differenziazione verso la linea eritroide potrebbero rappresentare un target per l'infezione da HIV [75]. Inoltre, è stata dimostrata anche l'espressione

di CXCR4 in CD34+ BFU, anche se il suo livello di espressione diminuisce durante il differenziamento eritroide. La disfunzione del differenziamento eritroide potrebbe essere correlata a danni a livello del microambiente midollare e alla riduzione delle cellule stromali. IL-1 β , IFN γ , TGF β 1 e TNF α sono in grado di sopprimere la crescita delle cellule progenitrici in vitro e possono svolgere un ruolo importante nell' induzione di anemia associata ad HIV. Alcuni lavori hanno suggerito che l'HIV possa compromettere i meccanismi di feedback EPO-correlati che regolano l'omeostasi dei globuli rossi. La riduzione della concentrazione di Hb induce la produzione di EPO, mentre in molti pazienti con HIV la presenza di anemia è associata ad una diminuzione della concentrazione sierica di EPO, che risulta indipendente dal danno renale. Inoltre, diversi esperimenti in vitro hanno dimostrato che l'HIV-1 determina una riduzione della sintesi di EPO. Diversi meccanismi sono stati considerati per spiegare questa riduzione EPO [78-79-80-81-82]. L'up-regolazione delle citochine pro-infiammatorie (IL-1 β e TNF- α) down-regola direttamente l'espressione di EPO in vitro, attraverso la formazione di specie reattive dell'ossigeno, che a loro volta danneggiano l'affinità di legame dell' EPO. Inoltre, gli anticorpi circolanti anti-EPO sono rilevabili in circa il 23 % dei pazienti affetti da HIV, e uno studio prospettico su 113 pazienti ha mostrato che gli anticorpi anti-EPO potrebbe essere considerati un fattore di rischio indipendente per l'anemia [83-84-85]. La presenza di questi autoanticorpi diretti contro diversi obiettivi, è stato associata al mimetismo molecolare e alla disregolazione del sistema immunitario. Recenti studi hanno dimostrato che gli anticorpi anti-EPO riconoscono principalmente tre epitopi dell'EPO che si estendono su tre regioni, tra cui i domini amminoacidi 1-20 (EP1), 54-72 (EP5) e 147-166 (EP12) di cui EP1 e EP12 sono i domini che sono coinvolti nell'interazione EPO-EPOR. La regione corrispondente alla EP1 mostra una omologia di sequenza del 63% con la sequenza amminoacidica di p17 di HIV. L'anemia associata ad HIV potrebbe anche essere indotta da emolisi. Infatti in alcuni pazienti affetti da HIV, sono stati osservati casi di emolisi che sono collegati a CID, deficit di glucosio-6-deidrogenasi, auto-anticorpi contro i globuli rossi, porpora trombocitopenica e trattamento farmacologico. Sebbene

l'emolisi costante è rara nei pazienti con HIV, il danno e la lisi dei globuli rossi da auto-anticorpi possono essere considerate un ulteriore meccanismo di anemia associata ad HIV.

In conclusione, l'insorgenza di trombocitopenia e anemia rappresentano importanti manifestazioni patologiche in pazienti affetti da HIV. La patogenesi di queste citopenie è multifattoriale, ma sicuramente possono intervenire diversi attori, come le HPC, le cellule in differenziamento, la deregolazione citochinica e la compromissione delle cellule stromali [86-87].

L'indagine dei diversi meccanismi che sono coinvolti nella genesi di queste citopenie ha fornito importanti risultati sulla patogenesi dell'HIV, anche se alcuni elementi cardine, quali la suscettibilità delle HPC per l'infezione da HIV e il loro ruolo come serbatoi di infezione, sono ancora in discussione e meritano ulteriori analisi sperimentali [4].

1.3 Le cellule staminali

Le cellule staminali sono cellule primitive, non specializzate, caratterizzate dalla capacità di autorinnovamento e di differenziazione. Esse sono quindi in grado di generare, dividendosi, due cellule differenti tra loro, di cui una è uguale alla cellula madre (staminale), mentre l'altra è differente (progenitore) e potrà originare una progenie cellulare con caratteristiche diverse e peculiari.

Le cellule staminali possono essere di due tipologie: cellule staminali embrionali, ovvero cellule con potenzialità illimitata, e cellule staminali adulte. Le cellule staminali embrionali caratterizzano i primi stadi della vita embrionale, infatti sono presenti nella massa cellulare interna della blastocisti, poco prima dell'impianto nella mucosa uterina, mentre le cellule staminali adulte (o somatiche) comprendono quelle fetali, presenti negli abbozzi degli organi, quelle neonatali, isolabili dal cordone ombelicale e quelle propriamente adulte, presenti in molti degli organi del nostro corpo.

Le cellule staminali possono essere inoltre distinte sulla base del loro potenziale proliferativo. Le cellule staminali totipotenti sono cellule in grado di dare origine a qualunque organo o tessuto, compresi i tessuti extraembrionali, le cellule pluripotenti sono in grado di differenziarsi in tutti i tipi cellulari derivati da mesoderma, endoderma ed ectoderma, le cellule multipotenti o cellule progenitrici sono in grado di differenziarsi in molti tipi cellulari, appartenenti però ad un unico tessuto, ed infine quelle unipotenti le quali sono in grado di dar luogo ad un unico tipo cellulare.

1.4 Le cellule staminali ematopoietiche

Le cellule staminali ematopoietiche sono cellule in grado di dare origine a tutte le cellule linfoidi e mieloidi del sangue, midollo osseo e timo. Esse possono differenziarsi sia in cellule di tessuti non ematopoietici, come fegato, pancreas, cuore, cervello e rene, sia in cellule che daranno poi origine a tutte le cellule del sangue [89-90-91]. Tali cellule possiedono tre caratteristiche: sono pluripotenti, ovvero in grado di generare più tipi cellulari appartenenti ai tre diversi foglietti embrionali, hanno un alto potenziale proliferativo e sono dotate di autorinnovamento [88].

Le cellule staminali ematopoietiche risiedono nel midollo osseo, in particolari regioni, denominate nicchie, dove rappresentano l'1-3% della popolazione cellulare. Esse sono presenti anche a livello del sangue periferico, in percentuale minore (0,001-0,1%), e a livello del cordone ombelicale, dove si riscontra una percentuale pari allo 0,1-0,5%.

Il midollo osseo (BM) forma un ambiente adatto per la sopravvivenza, crescita e differenziamento delle cellule staminali.

Le componenti cellulari del midollo osseo includono le HPC, le linee cellulari derivate dalle HPC e le cellule stromali.

Le cellule progenitrici HPC rappresentano una popolazione eterogenea di cellule CD34+ che include le cellule staminali ematopoietiche più primitive (HSC), che si caratterizzano per la pluripotenza e un'elevata capacità di autorinnovamento, e i progenitori multipotenti (PMP), che provengono dalle HSC e che possiedono una capacità più limitata di autorinnovamento. I progenitori multipotenti possono differenziarsi in progenitori comuni linfoidi (CLPS) e progenitori comuni mieloidi (CMP). I progenitori comuni linfoidi, a loro volta, possono differenziarsi in cellule B e T, cellule natural killer e cellule progenitrici dendritiche plasmacitoidi. Il differenziamento delle cellule T avviene nel timo, mentre i progenitori comuni mieloidi differenziano nel midollo osseo, in diverse linee cellulari, tra cui granulociti, eritrociti, megacariociti e monociti [93]. Le filiere derivate dai progenitori comuni mieloidi migrano nel sangue, ad eccezione di megacariociti, i

quali rimangono a livello del midollo osseo (**Figura 6**). Il differenziamento delle cellule staminali emopoietiche è regolata da specifici fattori di crescita ematopoietici che inducono la sopravvivenza, proliferazione e maturazione delle linee cellulari specifiche. Questi fattori condividono diverse proprietà comuni e agiscono gerarchicamente a diversi stadi di differenziazione, e mostrano spesso interazioni sinergiche con altri fattori di crescita. Le cellule stromali sono la fonte principale di questi fattori, con le eccezioni di eritropoietina (EPO) e trombopoietina (TPO), che sono in gran parte prodotte rispettivamente nei reni e nel fegato.

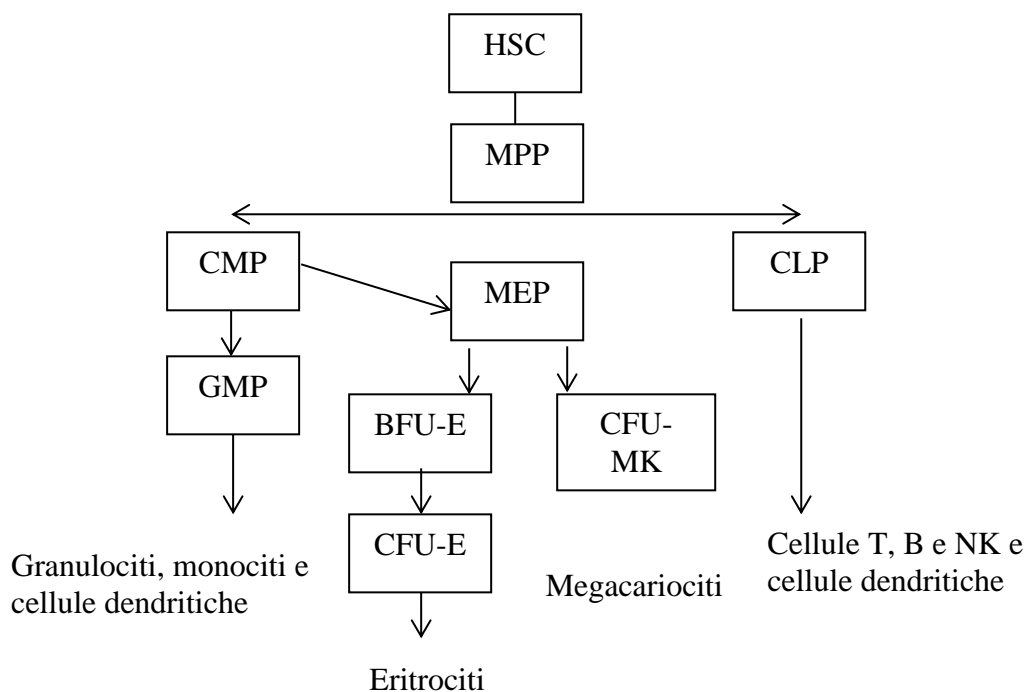


Figura 6: Ematopoiesi umana. HSC: Cellula staminale ematopoietica; MPP: progenitore multipotente; CLP: progenitore linfoide comune; CMP: progenitore mieloide comune.

L'antigene CD34 è il marcatore di una popolazione cellulare molto eterogenea, sia morfologicamente che immunologicamente, la cui caratteristica comune è di generare, in vitro, aggregati clonali e, in vivo, dalla capacità di ricostruire la mielo-linfoiesi nel ricevente sottoposto a terapia mielo-linfoablattiva.

Questo marcatore è espresso dallo 1–3% delle cellule del midollo, dallo 0,01–0,1% delle cellule del sangue periferico e dallo 0,1–0,5% delle cellule del cordone ombelicale.

L'espressione dell'antigene CD34 può essere associata a quella di altri marcatori (**Figura 7**).

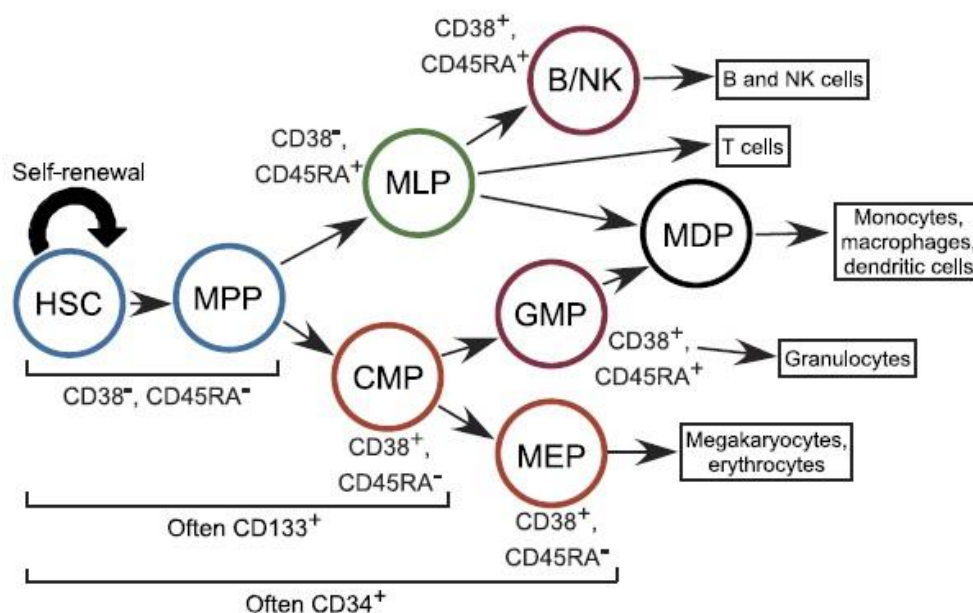


Figura 7: Rappresentazione schematica delle varie fasi differenziali e dei rispettivi antigeni superficiali.

In particolare sono presenti i marcatori “non *lineage* specifici”, (come CD38, Thy1 o CD90, CD45RA, HLA-DR, CD71) e marcatori “*lineage* specifici”. Tra questi troviamo i marcatori presenti a livello dei linfociti T (come il TdT, CD7, CD10, CD5, CD2), quelli presenti a livello dei linfociti B (come TdT, CD10, CD19), quelli caratteristici della linea mieloide (CD33, CD13), ed infine quelli caratteristici di quella megacariocitaria (CD41, CD61, CD42b). I marcatori “non *lineage* specifici” sono inoltre differenzialmente espressi a livello delle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche. In tabella riporto tali espressioni antigeniche [88].

Cellule staminali	Cellule progenitrici
CD34 ⁷⁺	CD34 ⁺
CD38 ⁻	CD38 ⁺
c-kit ^{low}	c-kit ⁺
HLA-DR ^{-/low}	HLA-DR ⁺
CD45RA ^{-/low}	
CD71 ⁻	
KDR ⁺	KDR ⁻
ALDH ⁺	ALDH ⁻
CD90 ^{low}	CD90 ⁻

Tabella 1: Espressione antigenica in cellule staminali e progenitrici ematopoietiche.

1.5 HIV e cellule progenitrici ematopoietiche CD34+ (HPCs)

L'incidenza delle citopenie nel sangue periferico in soggetti HIV positivi ha portato all'ipotesi che l'HIV possa compromettere l'omeostasi del midollo osseo e influenzare la biologia e l'attività delle HPC. I primi studi hanno osservato che l'infezione da HIV è correlata con l'esaurimento di HPC e con una significativa riduzione della crescita in vitro di tali cellule, purificate da pazienti infetti. Questo suggerisce che le molteplici citopenie periferiche possano essere correlate, almeno in parte, ad una produttiva infezione da parte di HIV a livello delle HPCs.

L'infezione da HIV può determinare un progressivo impoverimento delle HPC causato dalla lisi cellulare, che a sua volta porta allo sconvolgimento del differenziamento verso varie linee cellulari. Questa ipotesi di una possibile infezione da HIV a livello delle HPC può comportare inoltre un elemento importante nella dinamica della malattia da HIV: le HPC possono ospitare il DNA provirale di HIV nel proprio genoma e agire come un serbatoio supplementare di infezione.

È interessante notare i recettori e i co-recettori che possono essere rilevati sulla membrana cellulare delle HPC. Studi eseguiti mediante citometria a flusso hanno mostrato che il 25-65 % di cellule CD34 + HPC purificate da midollo osseo di donatori sani esprime la proteina CD4. Anche i principali co-recettori CXCR4 e CCR5 sono stati dimostrati essere espressi sulle membrane di tali cellule. In particolare le proteine CXCR4 e CCR5 sono espresse rispettivamente nel 53 % e nel 35 % delle cellule CD34+. Tuttavia, l'espressione del CXCR4 e del CCR5 dipende dalla fase del differenziamento [94-95-96].

L'espressione di recettori e dei co-recettori sulle membrane delle cellule progenitrici CD34+ suggerisce che queste cellule potrebbero essere considerate un possibile bersaglio di infezione.

Per esplorare questa ipotesi, sono stati intrapresi due differenti approcci sperimentali da parte di diversi gruppi di ricerca [97-98]. Il primo è rappresentato

dal trattamento delle cellule progenitrici prelevate da sangue cordonale o da midollo osseo di donatori sani con diversi ceppi di HIV, mentre il secondo è basato sull'analisi e sul rilevamento di acidi nucleici e/o proteine virali in cellule progenitrici isolate da pazienti infetti. Questi studi erano basati sull'isolamento e purificazione di HPC che rappresentano una popolazione cellulare eterogenea perché il CD34 è un marcatore che è possibile rilevare non solo CSE e PMP ma anche sui progenitori mieloidi più commissionati, come CFU-GEMM , CFU-GM, BFU-E e CFU-MK. Diversi studi hanno messo in luce che le HPC CD34+ isolate da midollo di donatori infetti, erano resistenti all'infezione da HIV [99]. Inoltre l'analisi del DNA provirale o dell'RNA virale in tali cellule trattate con differenti ceppi HIV-1 non ha rivelato una significativa evidenza di infezione da HIV.

In parziale contrasto con questi dati, Chelucci e collaboratori [100] hanno purificato HPC CD34+ dal sangue periferico di donatori sani, le hanno coltivate con EPO, GM-CSF, interleuchina-3 (IL-3) e SCF e poi trattate con differenti ceppi HIV-1. L'analisi della proteina p24 ha mostrato che il 12 % delle colonie CFU-GM e meno dell' 1 % di quelle BFU -E erano positive, mentre le CFU -GEMM erano negative. È interessante notare che le cellule staminali HPC più ancestrali, che sono bloccate nella fase G0 del ciclo cellulare, non risultano permissive all'infezione da HIV, e altri gruppi di ricerca hanno dimostrato che la porzione più primitiva più primitiva (CD34+/CD38-) non è suscettibile all'infezione di HIV-1 o HIV -2. Tuttavia, una infezione limitata è stata rivelata nelle prime settimane di coltura a livello delle cellule CD34+/CD38 + (HPC meno ancestrali), suggerendo che l'infezione potesse coinvolgere a bassa portata solo le HPC più commissionate, ma non quelle più primitive [101-102].

E' stata quindi indagata la presenza del DNA provirale in HPC isolate da pazienti HIV- positivi. Due studi, basati su metodiche di PCR per rilevare la presenza del DNA provirale in HPC isolate da midollo, hanno dimostrato che i pazienti in cui era rilevabile il DNA provirale erano 1 su 14 nel primo studio e 1 su 11 nel secondo [103-104]. In contrasto con questi risultati, una maggiore percentuale di cellule progenitrici risultate positive all'HIV-1 era stata osservata in alcuni gruppi

di individui positivi specialmente in stadi più avanzati della malattia [105-106]. Questa discrepanza potrebbe essere legata all'uso di diversi saggi di PCR con differenti sensibilità, e l'eventuale presenza di contaminanti di cellule stromali infette.

Nonostante questi risultati controversi, attualmente si ritiene che l'infezione delle HPC si è verificata, in alcune condizioni sperimentali, ma in una bassa frazione di HPC, ovvero in quelle più commissionate, mentre la HPC più primitive non sono state considerati un importante obiettivo di HIV.

Diversi meccanismi sono stati proposti per spiegare la resistenza da parte di questa cellule all'infezione da HIV. Esse secernono il ligando del CCR5, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES e il ligando di CXCR4 (SDF-1), che possono competere con il legame tra gp120 e il corecettore.

Zhang e collaboratori hanno dimostrato che la proteina chinasi ciclina-dipendente p21 cellulare limita l'infezione delle HPC e interferisce con l'integrazione provirale del genoma HIV-1 [107]. Tuttavia, studi recenti hanno contestato la resistenza di tali cellule per l'infezione da HIV.

Uno studio ha descritto il sottotipo C del virus come responsabile dell'infezione alle HPC, dimostrando una positività di 12 pazienti su 19. È interessante notare che, ceppi HIV-1 sottotipo B non erano in grado di infettare HPC, suggerendo che solo specifici sottotipi di HIV potrebbero essere associati con l'infezione diretta di HPC [108].

Complessivamente, questi studi recenti hanno riesaminato la correlazione tra l'infezione da HIV e HPC, ma i dati rimangono ancora controversa e ulteriori studi sono necessari per valutare se l'infezione da HIV di HPC può essere associato con la comparsa di citopenia nel sangue o può rappresentare un ulteriore infezione da HIV reservoir.

Oltre all'analisi dell'infezione diretta a livello delle HPC, diversi studi sono stati condotti su granulociti - macrofagi CFU (CFU - GM), CFU - GEMMs o BFU - E. In questo contesto, le HPC isolate da pazienti infetti, hanno mostrato una ridotta crescita in vitro di BFU-E, CFU-GM e BFU-MK [109-110]. Questi risultati sono stati confermati anche dall'analisi di HPC purificate da individui

sani e trattate con HIV, anche se altri studi non hanno osservato una inibizione della crescita [111-112] probabilmente a causa delle differenti tra i ceppi di HIV utilizzati le differenti condizioni di coltura. La riduzione significativa della crescita di CFU - GEMM , CFU - GM , BFU -E e BFU - MK suggerisce un'alterazione della proliferazione di tali HPC, con il possibile coinvolgimento dell'apoptosi nell'induzione delle citopenie.

L'apoptosi svolge un ruolo importante nella deplezione di linfociti T CD4+, anche attraverso l'interazione di gp120 di HIV e CD4. Gp120 di HIV è anche in grado di indurre l'attivazione di apoptosi nelle cellule endoteliali, osteoblasti, e neuroni [113]. Questa regolazione negativa della proliferazione e della sopravvivenza è stata associata con l'aumento della produzione del TGF- β 1 da parte delle HPC e la presenza di un meccanismo Fas-dipendente [114]. Questa riduzione nella sopravvivenza e proliferazione causata dall'apoptosi potrebbe spiegare almeno in parte la diminuzione delle cellule progenitrici e dei precursori circolanti, osservata nei pazienti HIV-positivi [115] .

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'infezione da HIV induce non solo una progressiva riduzione del numero di linfociti T CD4+ ma determina una serie di lesioni a livello del compartimento emopoietico con la comparsa clinicamente rilevante di piastrinopenia, anemia e granulocitopenia. In particolare, la riduzione degli eritrociti viene rilevata nel 10% dei pazienti asintomatici e nel 92% di quelli con AIDS e l'anemia conseguente rappresenta un fattore predittivo negativo dell'evoluzione della infezione da HIV. L'avvento della terapia combinata antiretrovirale (cART) non ha determinato la scomparsa delle forme anemiche, le quali sono riscontrabili in diversi pazienti HIV positivi, suggerendo una patogenesi i cui meccanismi sono ancora da comprendere. Al momento, si ritiene plausibile che la riduzione degli eritrociti abbia una origine di tipo multifattoriale dove l'infezione da HIV, l'infiammazione cronica con deregolazione citochinica HIV indotta e la stessa terapia antiretrovirale giocano un ruolo negativo sulla differenziazione della filiera eritrocitaria, sin dalla cellula progenitrice ematopoietica CD34+.

L'obiettivo dello studio è stato quello di evidenziare alcuni dei possibili meccanismi coinvolti nella patogenesi dell'anemia nei pazienti HIV positivi. In particolare, si è studiata l'interazione di HIV e di proteine virali come gp120 sia sulle cellule progenitrici ematopoietiche CD34+ (HPCs) isolate da sangue cordonale sia lungo il differenziamento verso la filiera eritrocitaria indotto da eritropoietina (EPO).

I risultati ottenuti indicano come HIV e gp120 siano in grado di indurre apoptosi delle HPCs attraverso un circuito esocrino-paracrino indotto da citochine come TGF- β 1 con l'induzione di alcuni geni come GATA e TNF α . Inoltre, l'analisi dell'azione di HIV e gp120 sulla differenziazione verso la filiera eritrocitaria ha mostrato l'alterazione del ciclo cellulare con uno stravolgimento dell'equilibrio differenziazione/proliferazione correlato a una alterazione della regolazione

citochinica indotta dal virus, dove, in precise condizioni sperimentali, è stato possibile vedere una paradossale accelerazione del processo differenziativo in concomitanza di una riduzione consistente del numero di cellule eritrocitarie.

In particolare, le cellule progenitrici isolate da sangue cordonale, indotte inizialmente in differenziamento mediante apposite citochine e successivamente trattate con gp120, presentano nei primi 5 giorni dal trattamento un aumento di proliferazione e differenziamento, a cui segue un brusco arresto che culmina con aumento dell'apoptosi (dipendente dal legame gp120-CD4 e CXCR4 e TGF β 1 dipendente) e con una drastica riduzione del differenziamento. L'accelerazione del processo differenziativo si conclude quindi con una riduzione del numero di cellule terminalmente differenziate.

L'insieme dei risultati ha permesso di definire in modo consistente la complessità della genesi dell'anemia in questi pazienti e di poter suggerire anche nuovi target terapeutici per trattare l'anemia in questi soggetti, già sottoposti a terapia antiretrovirale convenzionale cART.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Preparazione dello stock virale

Gli stock virali HIV-1 IIB and HIV-1 ada sono stati preparati infettando rispettivamente le C8166 e i PBMC [118]. Brevemente, per la preparazione dello stock HIV-1 IIB, la linea cellulare linfoide C8166 viene infettata con il ceppo linfotropico HIV-1 IIB (5 ng/ml), mentre per la preparazione dello stock HIV-1 ada, le cellule mononucleate del sangue periferico, PBMCs, dopo essere state stimolate per 3 giorni con fitoemoagglutinina (PHA, 5µg/ml) e interleuchina 2 (IL-2, 10 U/ml), vengono infettate con il ceppo monotropico HIV-1 Ada (5 ng/ml).

Le cellule, una volta infettate, vengono mantenute per 2 ore a 37°C, e successivamente poste in terreno RPMI (Lonza, Germany) addizionato con FBS (siero bovino fetale, Gibco) al 10%.

Dopo 7-14 giorni dall'infezione, il sovrantante della coltura viene raccolto per la quantificazione dell'antigene p24 virale e conservato a -80. La quantificazione viene eseguita mediante lo strumento Vidas Biomerieux (France) utilizzando il kit ELISA HIV-1 p24 (Biomerieux, Marcy L'Etoile, France).

3.2 Separazione delle cellule progenitrici ematopoietiche CD34+

Le cellule progenitrici ematopoietiche CD34+ sono state prelevate dal sangue cordonale ottenuto dalla Banca del Cordone presso il Policlinico S. Orsola-Malpighi (Bologna). Tali cellule sono state separate mediante selezione immunomagnetica positiva, utilizzando il kit EasySep™ Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit (Stemcell Technologies).

E' stata analizzata la purezza delle cellule progenitrici ematopoietiche così ottenute, per mezzo della valutazione citofluorimetrica (utilizzando il citometro a flusso BD FACScalibur, Becton Dickinson, USA) dell'espressione dell'antigene CD34.

Le cellule ottenute dalla separazione sono state inizialmente centrifugate a 4000 rpm per 4 minuti, risospese in PBS e marcate con l'anticorpo anti-CD34 FITC (Becton Dickinson, USA) per 30 minuti in ghiaccio. Dopo un ulteriore lavaggio in PBS di 4 minuti a 4000 rpm, le cellule sono state risospese ed analizzate mediante citometria a flusso.

E' stata considerata la popolazione CD34+ solo quella con una purezza maggiore del 95%.

3.3 Colture cellulari indifferenziate e trattamento virale

Dopo la separazione immunomagnetica, le cellule CD34+ sono state risospese in terreno Iscove's Modified Dulbecco's Medium IMDM (Lonza, Germany) a cui è stato aggiunto FBS al 2%, antibiotico penicillina-streptomina, IL-3 (Roche Diagnostics, Germany, 10 ng/ml), SCF (Roche Diagnostics, Germany 10 ng/ml) e GM-CSF (250 ng/ml) e poste ad una densità di 50000 cellule/ml.

Tali cellule sono quindi state trattate con HIV-1 IIIB (ceppo linfotropico), HIV-1 ada (ceppo monotropico), gp120 ricombinante (gp120, 5µg/ml, NIBSC, London, UK) e virus inattivato al calore.

In particolare, per l'infezione, le cellule progenitrici ematopoietiche sono state incubate per 2 ore a 37 °C con i due ceppi virali, lavate e successivamente poste in terreno. Il trattamento con gp120 viene invece eseguito mediante aggiunta della proteina ricombinante alla coltura cellulare. Il virus inattivato al calore HIV-1IIIB (hiHIV-1IIIB) e HIV-1ada (hiHIV-1ada) è stato ottenuto dopo un ciclo di inattivazione a 65°C per 30 minuti [119]. Le cellule, dopo essere state isolate, vengono trattate con 120 ng/ml di hiHIV-1 IIIB e HIV-1 ada e poste in terreno.

Contemporaneamente alla messa in coltura sono stati aggiunti diversi fattori quali anti-TGFβ1 neutralizzante (1µg/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA), TGF- β1

ricombinante (900 pg/ml, Peprotech, USA), CD4 solubile (sCD4 3ng/ml, NIBSC, London, UK), P5P (5 ng/ml, Sigma) e AMD3100 (0,5 μ M, Peprotech, London, UK). Tali fattori vengono aggiunti ogni 24 ore.

Sono state poi eseguite raccolte dopo 3 giorni dal trattamento con il virus attivo, inattivato al calore e con gp120 ricombinante.

3.4 Colture cellulari differenziate verso la linea eritroide e trattamento virale

Sono stati utilizzati due protocolli sperimentali. Nel primo le cellule CD34+ sono inizialmente messe in terreno IMDM con aggiunta di FBS al 2%, antibiotico penicillina-streptomina, IL-3 (10 ng/ml), SCF (10 ng/ml), GM-CSF (250 ng/ml) e trattate con HIV-1 IIIB (ceppo linfotropico) e HIV-1 ada (ceppo monotropico) inattivati al calore e gp120 ricombinante per 24 ore. Successivamente vengono indotte in differenziamento con eritropoietina (EPO, 4U/ml) e poste ad una densità di 50000 cellule/ml.

Nel secondo le cellule CD34+ sono inizialmente poste in terreno IMDM addizionato con FBS al 2%, antibiotico penicillina-streptomina, IL-3 (10 ng/ml), SCF (10 ng/ml), GM-CSF (250 ng/ml) ed eritropoietina (EPO, 4U/ml) e seminate ad una densità di 50000 cellule/ml. Dopo 24 ore dalla separazione, le cellule vengono trattate con HIV-1 IIIB (ceppo linfotropico) e HIV-1 ada (ceppo monotropico) inattivati al calore e gp120 ricombinante.

In entrambi i protocolli, dopo 4 giorni le cellule vengono rimesse in coltura in assenza di GM-CSF e SCF. Dopo 8 giorni le CD34 vengono mantenute in IMDM, FBS (2%) ed EPO (4U/ml). Il virus inattivato al calore e gp120 ricombinante vengono aggiunti ad ogni passaggio delle cellule.

Contemporaneamente alla messa in coltura sono stati aggiunti diversi fattori quali anti-TGF β 1 neutralizzante (1 μ g/ml, R&D Systems, Minneapolis, USA), TGF- β 1 ricombinante (900 pg/ml, Peprotech, USA), CD4 solubile (sCD4 3ng/ml, NIBSC,

London, UK), P5P (5 ng/ml, Sigma) e AMD3100 (0,5 μ M, Peprotech, London, UK). Tali fattori vengono aggiunti ogni giorno.

Sono state eseguite raccolte dopo 3, 6, 9, 12 e 16 giorni dal trattamento con il virus.

3.5 Analisi dell'apoptosi, del ciclo cellulare e dell'espressione della glicoforina A

E' stata valutata l'apoptosi ed il ciclo cellulare delle cellule progenitrici ematopoietiche indifferenziate e di quelle indotte in differenziamento e l'espressione della glicoforina A, marker differenziativo eritroide, di quelle indotte in differenziamento verso la linea eritrocitaria.

Le cellule sono state permeabilizzate in etanolo (70% in PBS) per 45 minuti, risospese in PBS, marcate con propidio ioduro (40 μ g/ml) e analizzate mediante citometria a flusso (FACScalibur, Becton Dickinson, USA).

Le cellule indotte in differenziamento vengono inizialmente pellettate, fissate in paraformaldeide (0,4% in PBS) per 45 minuti, risospese in PBS e marcate con anticorpo anti-glicoforina A PE (0,2 μ g, Becton & Dickinson, USA) per 30 minuti in ghiaccio. Successivamente vengono lavate e risospese in PBS. A questo punto può essere valutata l'espressione dell'antigene glicoforina A, marcatore differenziativo eritroide, mediante lo strumento FACScalibur (Becton Dickinson, USA).

3.6 Analisi del DNA virale in cellule CD34+

Il DNA provirale e cellulare è stato estratto mediante DNaseasy kit (Quiagen, Germany) ed amplificato in PCR classica utilizzando i primers SK431 ed SK462 per il gene gag.

SK431: GCTATGTCAGTTCCCCTTGGTTCTCT

Sk462: AGTTGGAGGACATCAAGCAGCCATGCAAA

L'amplicone di 142 bp viene evidenziato su gel di agarosio al 2%.

Il DNA provirale integrato estratto dal gel di purificazione del DNA genomico cellulare è stato analizzato mediante NESTED Alu-PCR: la prima amplificazione è stata effettuata con primers per Alu e Gag, mentre la seconda con primer specifici per l'LTR virale. L'amplicone di 100 bp viene quindi visualizzato su gel di agarosio al 3% [120].

Come controllo positivo è stata utilizzata la linea 8E5LAV, che contiene una sola copia integrata del genoma virale per ogni cellula.

3.7 Analisi dell'mRNA delle cellule progenitrici ematopoietiche

L'mRNA totale è stato estratto dalle cellule progenitrici indifferenziate e da quelle indotte in differenziamento mediante High Pure RNA isolation kit (Roche). L'RNA è stato retro-trascritto e amplificato utilizzando il kit Quantitect SYBR Green RT-PCR (Qiagen), per mezzo dello strumento LightCycler (Roche), utilizzando appositi primers, mostrati in tabella. L'amplificazione prevede uno step iniziale di retro-trascrizione (1 ciclo a 50°C per 20 min) seguito dall'attivazione iniziale della HotStar Taq DNA polimerasi (94°C for 15 min) e 40 cicli costituiti da tre steps: 94°C per 10 s, 60°C per 30 s e 72°C per 60 s). Gli ampliconi vengono analizzati su gel di agarosio all'1,5%.

Primers	Sequenza
18S F	5'-AGGAATTCCCAGTAAGTGCG-3'
18S R	5'-GCCTCACTAAACCATCCAA-3'
TGFβ1 F	5'-GACATCAACGGGTTCACTACCGG-3'
TGFβ1 R	5'-GAGGCAGAAGTTGGCATGGTAGC-3'
CD34 F	5'-ACCGGAGAAAGGCTGGGCGA-3'
CD34 R	5'-TGGCCGTTTCTGGAGGTGGC-3'
CCR5 F	5'-CGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTG-3'
CCR5 R	5'-GTGCCCTTCTTCTATTTTCGACACCG-3'
CXCR4 F	5'-AGCTGTTGGCTGAAAAGCTGGTCTAT-3'
CXCR4 R	5'-GCGCTTCTGGTGGCCCTTGGAGTGTG-3'

GATA 1 F	5'-GGCACAGGGCAGCCGAAGG-3'
GATA 1 R	5'-GCTGAGCGGAGCCACCACAG-3'
GATA 2 F	5'-AGCGTCTCCAGCCTCATCTTCCGCG-3'
GATA 2 R	5'-CGAGTCTTGCTGCGCCTGCTT-3'
CD4 F	5'-CACCACCAGGTTCACTTCCT-3'
CD4 R	5'-CTAAGCTCCAGATGGGCAAG-3'
IKK F	5'-CGCCCAAGCACCCGGATACAG-3'
IKK R	5'-CGTCAGACGCTGGCCTCCAAA-3'
TNF α F	5'-CCCCAGGGACCTCTCTCTAA-3'
TNF α R	5'-GAGGTACAGGCCCTCTGATG-3'
IL-6 F	5'-GACAACCTTTGGCATTGTGG-3'
IL-6 R	5'-ATGCAGGGATGATGTTCTG-3'
Glo F	5'-CTTCAAGCTCCTGGGAAATGT-3'
Glo R	5'-GCAGAATAAAGCCTACCTTGAAAG-3'
STAT5F	5'-TTACTGAAGATCAAGCTGGGG-3'
STAT5R	5'-TCATTGTACAGAATGTGCCGG-3'
JunF	5'-GGGAATTCAAACCCACCTTGGCGCTCAA-3'
Jun R	5'-GCGGATCCGGACCCTTGAGACCCCGATA-3'
Fos F	5'-AATAAGATGGCTGCAGCCAA-3'
Fos R	5'-TTGGCAATCTCGGTCTGCAA-3'
GlyAF	5'-AATTGTGAGCATCAGCATC-3'
GlyAR	5'-GGGTCTGAGCTGAACTCAG-3'

Tabella 2: Sequenza nucleotidica dei primers utilizzati.

3.8 Coltura in terreno semi-solido di metilcellulosa

Le cellule progenitrici ematopoietiche, dopo la separazione, vengono coltivate in terreno semi-solido MethoCult™ - H4434 Classic (STEMCELL technologies), contenente appositi fattori differenziativi, per 14 giorni, seguendo il protocollo indicato. Dopo 14 giorni vengono contate e valutate le colonie BFU-E e CFU-E.

3.9 Trasfezione delle HPC e analisi del promotore del TGF- β 1 e IL-6

Le cellule progenitrici, dopo 24 ore dalla separazione, vengono trasfettate con 1 μ g di TGF- β 1 siRNA (Santa Cruz Biotechnology, USA) e con i diversi mutanti di delezione del promotore del TGF- β 1 (1 μ g) e del promotore dell'interleuchina 6 (1 μ g), utilizzando il programma U008 dello strumento Amaxa Nucleofector (Lonza) ed il kit Amaxa Human CD34+ Cell Nucleofector Kit (Lonza).

Dopo la trasfezione, le cellule vengono seminate ad una densità di 5×10^4 cell/ml in terreno IMDM, a cui viene aggiunto FBS al 2% e gli appositi fattori differenziativi. Dopo 24 ore dall'aggiunta degli stimoli, le cellule vengono trattate con gp120 ricombinante e HIV inattivato al calore. Dopo 3, 6, 9 e 12 giorni vengono eseguite delle raccolte per la valutazione dell'mRNA di diversi geni, dell'apoptosi, del ciclo cellulare e dell'espressione proteica della glicoforina A.

Il plasmide contenente cinque diverse porzioni del promotore del TGF- β 1 è stato costituito clonando tali porzioni nel vettore pGEM-4 (Promega, WI, USA). I mutanti, mostrati nella figura sottostante, sono stati inseriti sfruttando il sito di restrizione SmaI. Il primo clone consta del promotore intero (da -1362 a +11), il secondo presenta una delezione di 230 nt, il terzo di 631, il quarto di 802 ed il quinto di 1187. In coda ai costrutti è stato inserito il gene reporter CAT (cloranfenicolo-acetiltrasferasi) utilizzando il sito di taglio di SacI presente nel polylinker del plasmide.

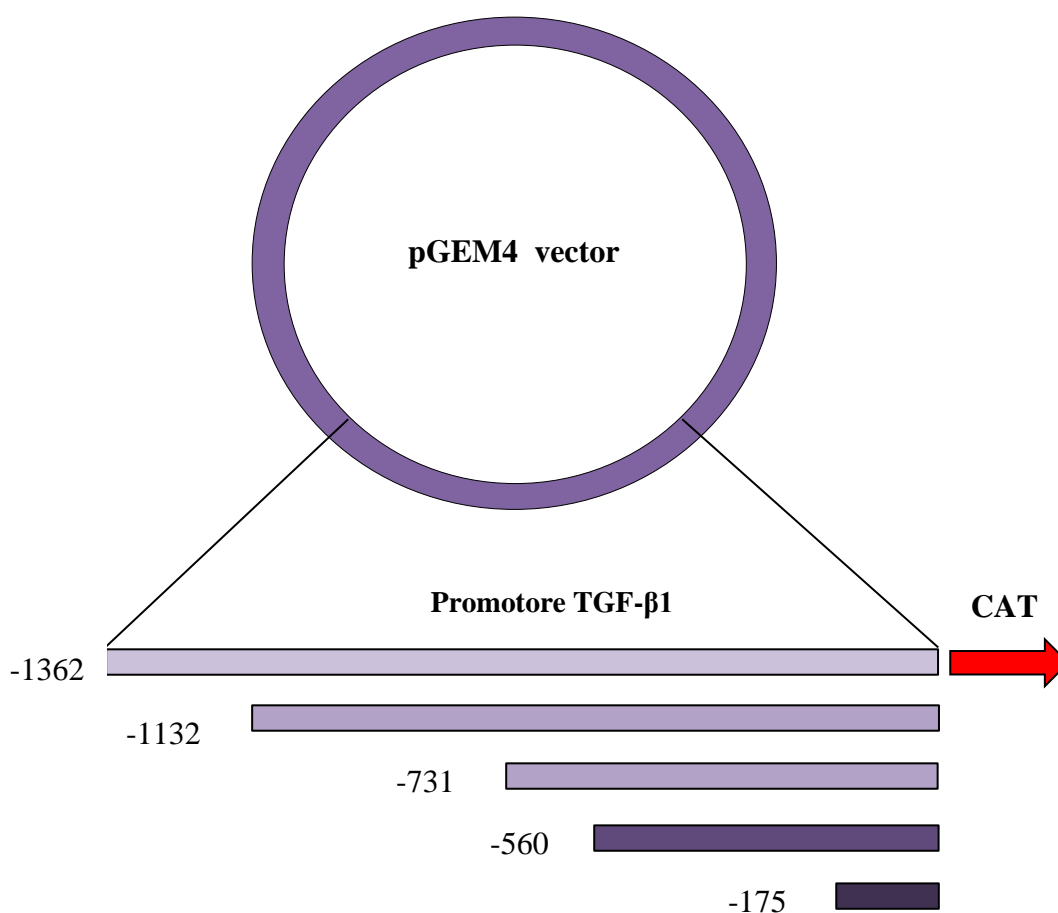


Figura 8: Schema del vettore pGEM-4 contenente le diverse porzioni del promotore del TGF- β 1 e il gene reporter CAT

Le diverse porzioni del promotore dell'interleuchina 6 (IL-6) sono state clonate nel vettore pCAT basic (Addgene, Cambridge, USA) tra HindIII e SacI del polylinker del plasmide e a monte del gene reporter CAT, già presente nel vettore. Il primo clone contiene la porzione intera del promotore (1287 nt), il secondo contiene la porzione di promotore deleta di 575 nt, il terzo quella deleta di 1001 nt ed il quarto quella deleta di 1115 nt, come riportato nello schema sottostante.

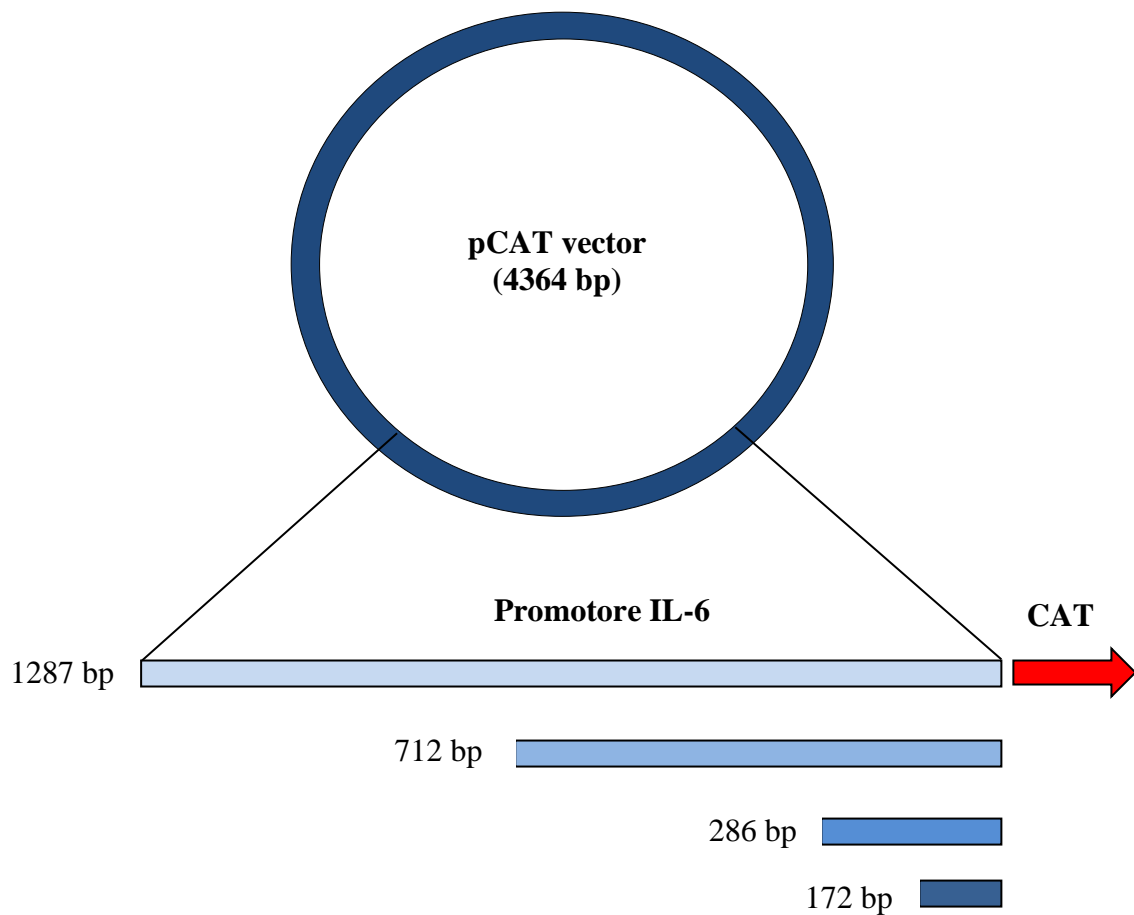


Figura 9: Schema del vettore pCAT-basic contenente le diverse porzioni del promotore dell'IL-6.

Per valutare la regione del promotore attivata durante il trattamento con il virus è stato amplificato in Real Time RT PCR il gene CAT utilizzando i primers CAT F (5'-GCGTGTTACGGTGAAAACCT-3') e CAT R (5'-GGGCGAAGAAGTTGTCCATA-3'), secondo il seguente profilo termico: retrotrascrizione a 50°C per 20 minuti e 45 cicli di denaturazione a 94°C per 10 secondi, annealing a 60°C per 15 secondi ed extension a 72°C per 30 secondi.

3.10 Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard di esperimenti condotti in triplicato. L'analisi statistica è stata eseguita mediante il test t di Student.

4. Risultati

4.1 Interazione tra HIV-1 e cellule progenitrici ematopoietiche (HPCs) indifferenziate

4.1.1 Le cellule progenitrici ematopoietiche non sono suscettibili all'infezione da parte di HIV-1

Le cellule progenitrici ematopoietiche sono state isolate da sangue cordonale umano mediante selezione immunomagnetica positiva. La percentuale di cellule CD34⁺, nella popolazione cellulare isolata, è stata valutata in citometria a flusso, mediante l'analisi del marker CD34, presente sulla membrana cellulare. L'arricchimento delle cellule CD34⁺, con questa procedura, ha permesso di ottenere una popolazione cellulare esprime il marker CD34 pari almeno al 95% delle cellule totali isolate (**Figura 10**).

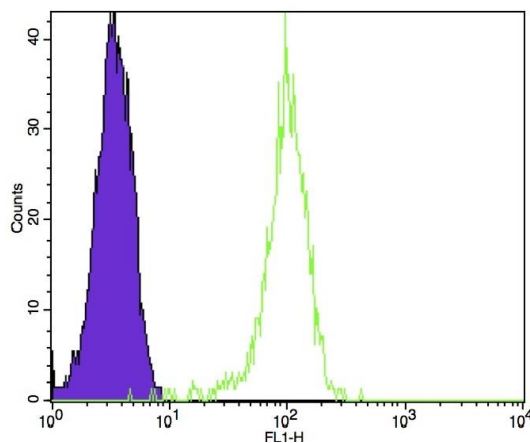


Figura 10: Istogramma ottenuto mediante citometria a flusso della purezza delle cellule progenitrici ematopoietiche CD34⁺. In verde si evidenzia l'espressione dell'antigene CD34 mediante anticorpo anti CD34-FITC.

Nel primo gruppo di esperimenti abbiamo voluto riconsiderare un punto molto controverso della patogenesi dell'infezione da HIV. Questo tema riguarda la

suscettibilità e permissività all'infezione da HIV delle cellule progenitrici ematopoietiche CD34+ (HPCs). Infatti, diversi studi [97-102], hanno presentato risultati positivi o negativi a seconda del ceppo virale, delle condizioni sperimentali e dei metodi di analisi impiegati. Nel nostro sistema sperimentale, le HPCs sono state messe a contatto con HIV-1_{IIIb} e HIV-1_{ada} per 2 ore a 37°C. Dopo diversi lavaggi in PBS, le HPCs sono state poste in terreno IMDM (2% FBS) con SCF (10 ng/ml) e IL-3 (10 ng/ml). Le colture di HPCs sono state valutate per la presenza del DNA provirale, mediante PCR sul DNA estratto dalle cellule, e per la presenza della proteina p24 a livello del surnatante della coltura, mediante metodica ELISA, dopo 7 giorni dal trattamento con il virus. L'analisi della presenza di DNA provirale non ha dato esito positivo (**Figura 11**) così come non è stato possibile rilevare la presenza anche di minime quantità di p24 nel surnatante. Questi risultati indicano come nelle nostre specifiche condizioni sperimentali e con i ceppi virali indicati, le HPCs siano resistenti all'infezione da HIV-1.

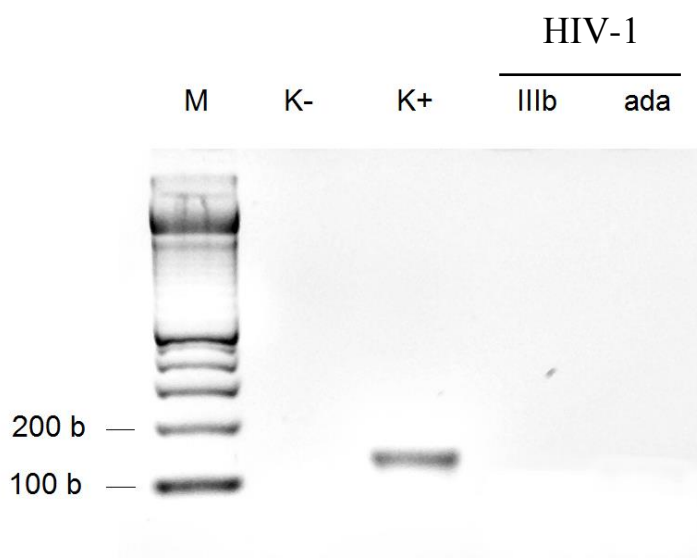


Figura 11: Gel di corsa elettroforetica per la valutazione della presenza del DNA virale a livello delle HPCs infettate con i ceppi virali HIV-1 IIIb e HIV-1 ada. Il controllo positivo è rappresentato dalla linea cellulare 8E5LAV, che contiene una copia integrata per cellula.

4.1.2 HIV-1 induce apoptosi in HPMCs isolate da cordone ombelicale

Abbiamo quindi valutato se HIV-1 possa indurre apoptosi nelle HPCs isolate da sangue cordonale. HPCs sono state trattate con HIV-1_{IIB}, HIV-1_{ada}, sia nella forma infettante sia in quella inattivata al calore (hiHIV-1_{IIB}, hiHIV-1_{ada}) e con gp120 ricombinante (rgp120). L'analisi dell'apoptosi in citometria a flusso con il metodo del propidio ioduro ha permesso di evidenziare un aumento significativo dell'apoptosi già a 72 ore dal trattamento stesso (**Figura 12**). Nelle HPCs messe a contatto con il virus attivo la percentuale di cellule in apoptosi risultava pari al 16±3%, in quelle che sono state messe a contatto con il virus inattivato al calore è pari al 18±4%, in quelle trattate con rgp120 è pari al 15±5%, mentre l'apoptosi del controllo non trattato è del 6±2% ($p < 0,05$).

Inoltre, l'analisi del ciclo cellulare indica una riduzione della quota in replicazione (fase S/G₂/M) nelle cellule trattate con i vari stimoli virali (**Figura 13**). Nel campione di controllo la percentuale di cellule in fase G₀/G₁ e S/G₂/M è rispettivamente del 50±6% e del 38±4%, mentre nel campione trattato con il virus la percentuale in G₀/G₁ ed S/G₂/M è rispettivamente del 45±5% e 31±4%.

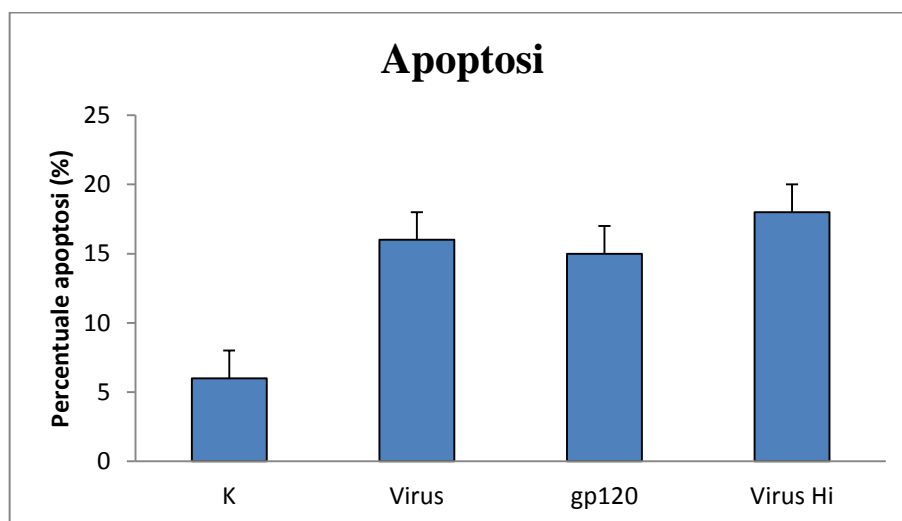


Figura 12: Percentuale di apoptosi nel controllo non trattato, nel campione trattato con virus attivo, inattivato al calore e gp120 ricombinante.

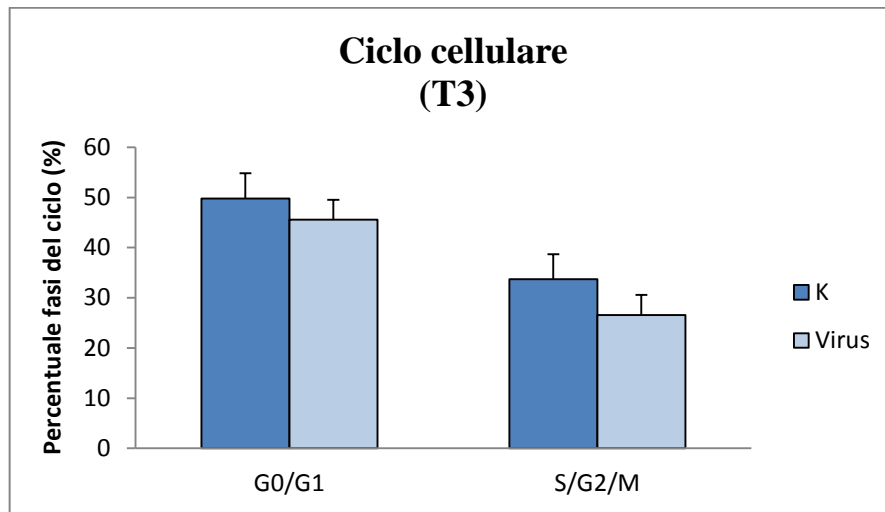


Figura 13: Percentuale delle fasi S/G₂/M e G₀/G₁ nel campione di controllo e in quello trattato con il virus inattivato al calore e con gp120 ricombinante dopo 3 giorni dal trattamento con il virus.

I risultati, in linea anche con precedenti studi su HPCs purificate da midollo osseo, indicano che le HPCs isolate da cordone ombelicale sono indotte dal virus attivo, inattivato al calore e da gp120, verso un incremento dell'apoptosi e una riduzione della fase proliferativa S/G₂/M rispetto al controllo non trattato già dopo 72 ore dal trattamento.

4.1.3 L'induzione dell'apoptosi è dipendente dall'interazione gp120-CD4/CXCR4

E' stato successivamente indagato se l'apoptosi fosse indotta o meno dal legame tra la glicoproteina virale gp120 e il recettore CD4 ed il corecettore CXCR4 a livello della membrana cellulare. Per fare ciò abbiamo aggiunto alla coltura il p5p o il CD4 solubile (per inibire il CD4) o AMD3100 (per inibire il CXCR4). In seguito è stata trattata la coltura cellulare con il virus HIV-1 IIIB attivo, inattivato al calore e con gp120 ricombinante. Come si evidenzia nel grafico sottostante (**Figura 14**), la presenza dell'antagonista del CD4 e del CXCR4 nel campione trattato, determinano una riduzione della percentuale di apoptosi, che ritorna al livello del controllo, dopo 4 giorni dal trattamento. Infatti la percentuale di

apoptosi del campione di controllo è del $6\pm 0,5\%$, nel campione trattato con il virus è del $16\pm 1\%$, mentre l'aggiunta in coltura dell'inibitore del CD4 e del CXCR4 in presenza del virus determinano una riduzione della percentuale di apoptosi rispettivamente del $9\pm 0,4\%$ e $8\pm 1\%$. La percentuale di apoptosi si abbassa ulteriormente se aggiungiamo simultaneamente entrambi gli inibitori: infatti in presenza di virus e di sCD4 ed AMD3100 la percentuale di apoptosi è pari al $5,4\pm 0,5\%$.

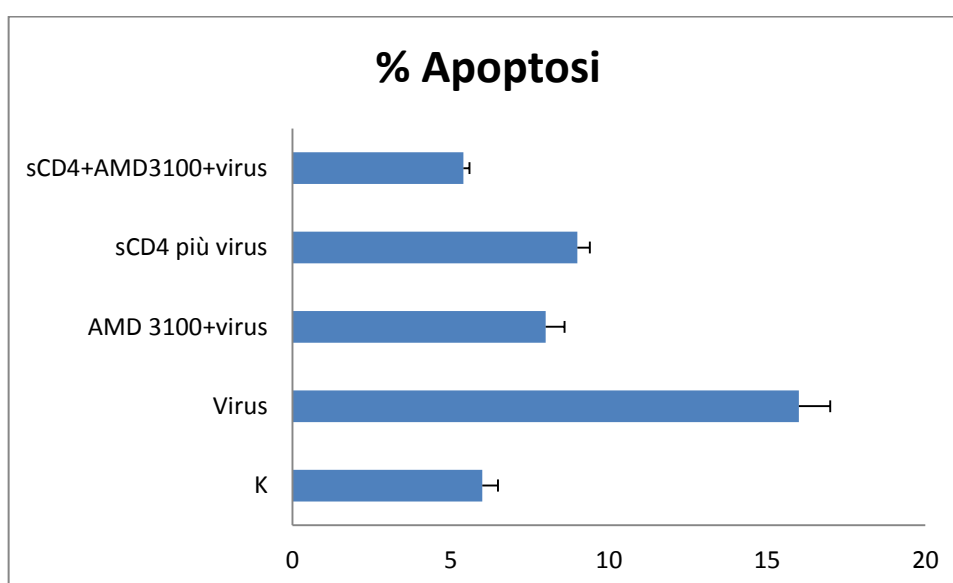


Figura 14: Percentuale di apoptosi nel campione di controllo, in quello trattato con il virus inattivato al calore, in quello trattato con virus e AMD3100, in quello trattato con virus e CD4 solubile ed infine in quello trattato con virus e AMD3100 e CD4 solubile.

4.1.4 Le cellule trattate con HIV-1 presentano l'alterazione dell'espressione di alcuni geni

Successivamente, abbiamo analizzato, mediante real time RT-PCR quantitativa (qRT-PCR), l'espressione nelle HPCs di alcuni geni cellulari coinvolti nel controllo della proliferazione e della vitalità cellulare, e di alcuni markers cellulari specifici. In particolare, un'analisi dell'espressione di TGF- β 1, IFI-16, CD34,

CXCR4, IKK e TNF α ha dimostrato un incremento dell'espressione del mRNA di questi geni quando le HPCs venivano cimentate con HIV, hiHIV e rgp120 rispetto al controllo non trattato (**Figura 15**). In particolare l'espressione del TGF- β 1 nel campione trattato con il virus aumenta di 6 ± 2 volte rispetto al controllo non trattato dopo 48 ore e di $2\pm 0,2$ volte a 96 ore dal trattamento (**Figura 16**). Il mRNA di CD34, GATA-1, GATA-2 è maggiore (rispettivamente di $3,1\pm 0,5$, $1,8\pm 0,2$ e $1,7\pm 0,2$ volte rispetto al controllo) dopo 48 ore dal trattamento e si riduce al di sotto del controllo dopo 96 ore ($p < 0,05$).

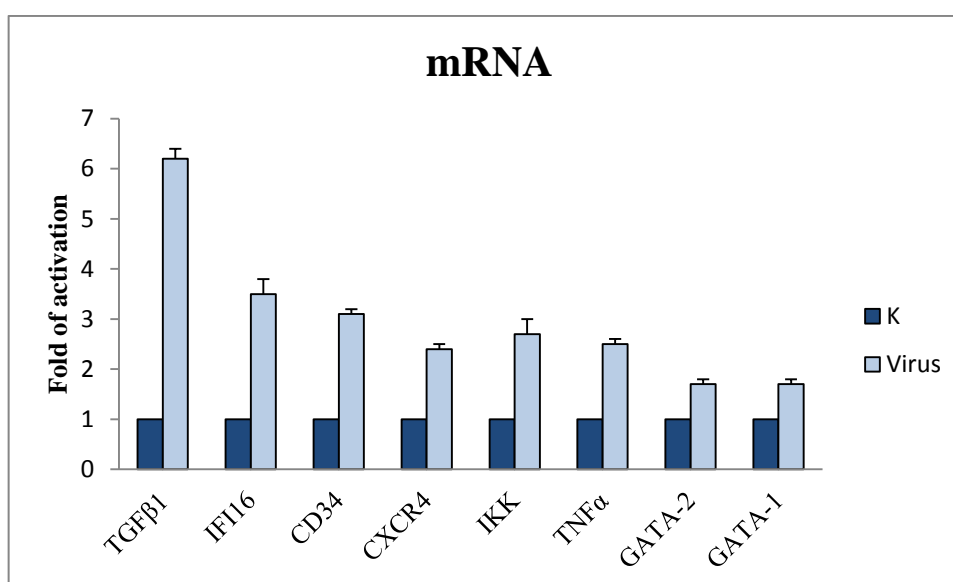


Figura 15: Espressione del mRNA di TGF- β 1, CD34, CXCR4, IKK e TNF- α nel controllo non trattato e dopo 48 ore dalla stimolazione con il virus inattivato e gp120 ricombinante.

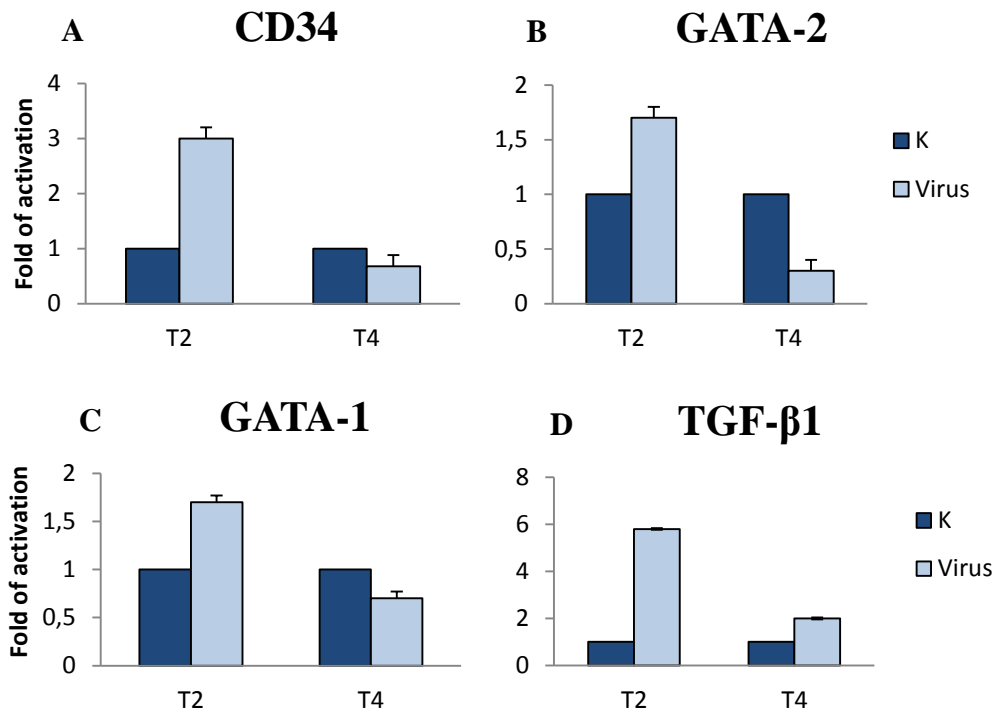


Figura 16: Espressione del mRNA di CD34 (A), GATA-2 (B), GATA-1 (C) e TGF-β1 (D) dopo 48 e 96 ore nel campione di controllo e in quello trattato con il virus inattivato al calore e con gp120 ricombinante

4.1.5 L'apoptosi indotta dal virus è correlata all'espressione di TGF-β1

L'aumento della espressione di TGF-β1 ci ha indotto a esplorare la relazione tra questo fattore ed HIV. TGF-β1 svolge un ruolo importante nella biologia del midollo osseo e già precedenti studi hanno suggerito un suo ruolo nell'alterazione delle varie filiere cellulari del midollo osseo in corso di infezione da HIV. In particolare, abbiamo analizzato l'azione di TGF sull'induzione dell'apoptosi HIV indotta e come mostrato dalla **Figura 17**, la presenza di un anticorpo neutralizzante policlonale diretto contro TGF-β1 riduce significativamente l'apoptosi delle HPCs indotta da HIV. Infatti, nel campione di controllo, dopo 3 giorni dal trattamento, la percentuale di apoptosi è pari al $6\pm 1\%$, in presenza di virus aumenta fino al $17\pm 4\%$, mentre con l'anticorpo neutralizzante si abbassa

fino a raggiungere la percentuale del controllo. In presenza di virus attivo, inattivato al calore e rgp120 l'apoptosi rispettivamente raggiunge il 16 ± 1 , il $16,2\pm 3\%$ ed il $16,2\pm 4\%$. Se a questi campioni, oltre al virus attivo, inattivato al calore e gp120, viene aggiunto l'anticorpo neutralizzante anti-TGF- $\beta 1$, l'apoptosi scende rispettivamente al $6\pm 1\%$, $6,2\pm 0,5$ e $5\pm 1\%$ ($p < 0,05$).

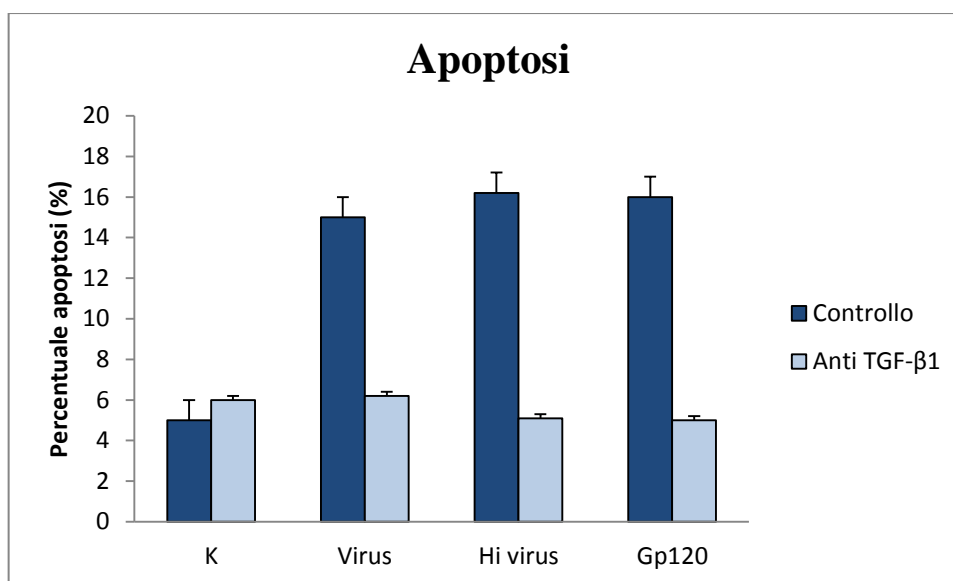


Figura 17: Percentuale di apoptosi nel campione di controllo, in quello trattato con il virus inattivato al calore e con gp120 ricombinante, in presenza ed in assenza dell'anticorpo neutralizzante anti TGF- $\beta 1$.

L'insieme dei risultati suggerisce uno scenario dove il segnale apoptotico indotto dal virus a livello della cellula progenitrice ematopoietica indifferenziata è mediato dall'interazione della gp120 con il CD4 e il corecettore CXCR4. Questa interazione viene poi a determinare, mediante vie di trasduzione di segnale ancora da individuare, l'attivazione dell'espressione del TGF- $\beta 1$, con induzione di apoptosi. Per caratterizzare tale attivazione, abbiamo studiato il promotore del TGF- $\beta 1$ per determinare i fattori trascrizionali che ne regolano l'induzione a seguito dell'esposizione a HIV delle HPCs.

Sono stati costruiti diversi plasmidi contenenti differenti porzioni del promotore del TGF- $\beta 1$.

In particolare abbiamo ottenuto diversi costrutti: il primo consta del promotore intero, il secondo del promotore deleto di 230 nt (da -1362 a -1132), il terzo del promotore deleto di 631 nt (da -1362 a -731), il quarto del promotore deleto di 802 nt (da -1362 a -560) ed infine il quinto di quello deleto di 1187 nt (da -1362 a -175). Tali costrutti vengono poi clonati a monte del gene CAT nel vettore pGEM4. I diversi plasmidi vengono quindi trasfettati nelle cellule progenitrici ematopoietiche indifferenziate e cimentate con il virus inattivato al calore e con gp120 ricombinante.

Dall'analisi delle diverse porzioni, è emerso che la regione implicata durante il contatto del virus sia quella compresa tra nt -1362 e nt -1132. Infatti, dall'analisi del mRNA del gene reporter CAT delle cellule progenitrici ematopoietiche trasfettate con i diversi costrutti risulta che la presenza di virus determini l'up-regolazione del gene CAT rispetto al controllo non trattato solo nelle cellule che hanno ricevuto il promotore intero (phTG1). Le cellule che invece perdono la prima porzione non presentano l'aumento del segnale del gene CAT in seguito a trattamento con il virus (**Figura 18**).

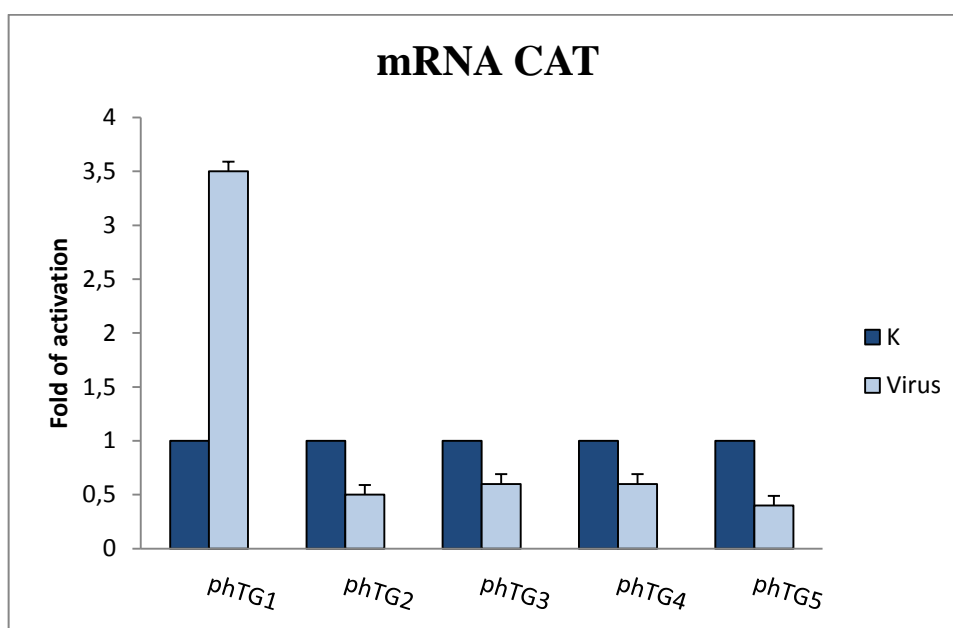


Figura 18: Espressione del mRNA del gene CAT in cellule progenitrici ematopoietiche trasfettate con i diversi costrutti in presenza di virus. Il costrutto 1 consta del promotore intero, il costrutto 2 presenta una delezione del promotore di 230 nt, il costrutto 3 presenta una delezione di 631 nt, il costrutto 4 presenta una delezione di 802 nt ed infine il costrutto 5 presenta una delezione del promotore di 1187 nt.

In questa regione sono presenti diversi siti per fattori trascrizionali (Jasper Database) che vengono riportati di seguito. L'analisi con site-directed mutagenesis dovrebbe permettere di identificare i fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione positiva del promotore di TGF- β 1.

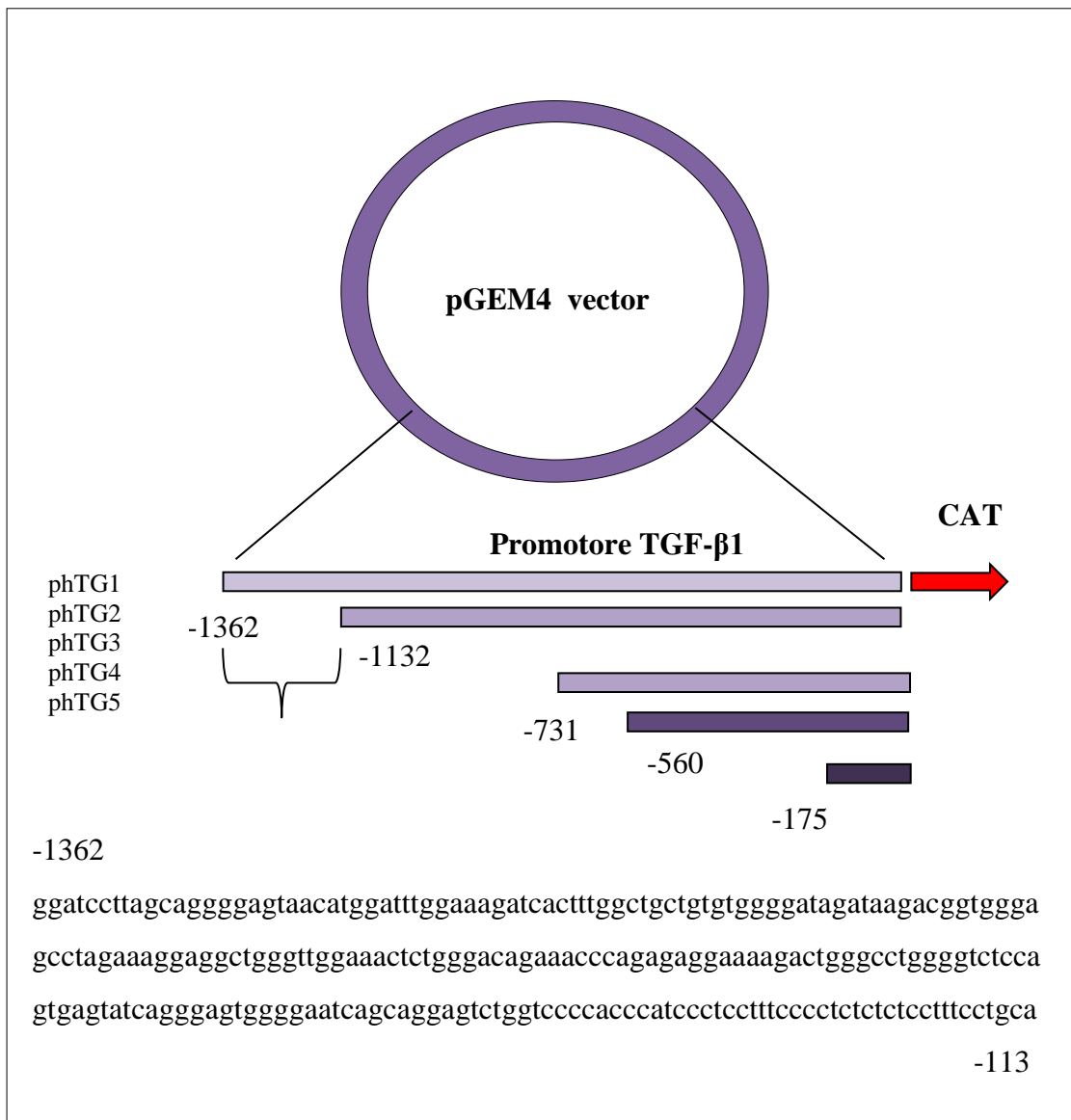


Figura 19: Rappresentazione schematica dei diversi costrutti di delezione del promotore del TGF-β1 e sequenza del promotore che viene interessata durante il trattamento virale.

Nome	Score	Sequenza
NR4A2	10.032	aagatcac
INSM1	10.206	ggcctggggctct
Spz1	10.330	ggggaatcagc
Myf	10.465	aatcagcaggag
SPIB	10.470	agaggaa

SP1	10.836	cccagcctcc
Gata1	11.830	atagataagac
Klf4	12.099	tgggtgggga
FEV	8.100	caggaaag
Zfx	8.128	aaagactgggcctg
NFATC2	8.134	ctttcca
SPIB	8.183	tggggaa
RUNX1	8.191	ctctctgggtt
NFKB1	8.310	gctgattcccc
NFIC	8.520	ttggct
NFATC2	8.660	gtttcca
Pou5f1	8.734	catggatttgaaag
RELA	8.799	cagagtttcc
RUNX1	8.845	gcctgggtct
SPIB	8.912	aggggaa
Klf4	8.999	agggagtggg
Gfi	9.083	caaatccatg
SP1	9.322	cccctctctc
NFATC2	9.490	ttttcct
SP1	9.538	cccactccc
SP1	9.803	cccatccctc

Tabella 3: Fattori trascrizionali, con relativi *score* e sequenze, presenti nella porzione del promotore del TGF- β 1 che viene attivata durante il trattamento con il virus.

4.2 Interazione tra HIV-1 e cellule progenitrici ematopoietiche indotte in differenziamento verso la linea eritroide

4.2.1 HIV-1 determina un aumento della apoptosi nelle cellule HPCs indotte in differenziamento verso la linea eritroide

Abbiamo successivamente studiato il differenziamento delle HPCs verso la filiera eritroide per comprendere se l'azione di HIV si sviluppi non solo sulle HPCs come tali ma anche lungo la filiera differenziativa eritroide. Questo studio potrebbe fornire la comprensione della genesi dell'anemia nei pazienti HIV positivi.

Per perseguire questo scopo abbiamo approntato due diversi protocolli di trattamento. Nel primo protocollo le cellule progenitrici ematopoietiche CD34+ isolate da sangue cordonale vengono messe in terreno IMDM ed FBS al 2% e trattate con HIV-1 IIIB inattivato al calore o rgp120. Dopo 24 ore dall'aggiunta del virus vengono aggiunti alla coltura SCF (10 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), GM-CSF (250 ng/ml) ed EPO (4U/ml). Vengono eseguite raccolte dopo 2 e 7 giorni. In questo protocollo viene prima aggiunto il virus e dopo si induce il differenziamento. Le HPCs indotte in differenziamento verso la filiera eritrocitaria, dopo 2 giorni dal trattamento con il virus inattivato al calore o rgp120 presentano una percentuale di apoptosi nel campione del controllo del $3,5\pm 0,5\%$ e del $7,6\pm 2$ in presenza di virus, mentre 7 giorni dal trattamento con il virus inattivato al calore e con gp120 ricombinante, presentano un aumento molto accentuato della percentuale di apoptosi. Infatti, nel campione di controllo la percentuale di apoptosi, è pari al $6\pm 1\%$, mentre in seguito al trattamento con il virus, arriva al $23\pm 5\%$ (**Figura 20**).

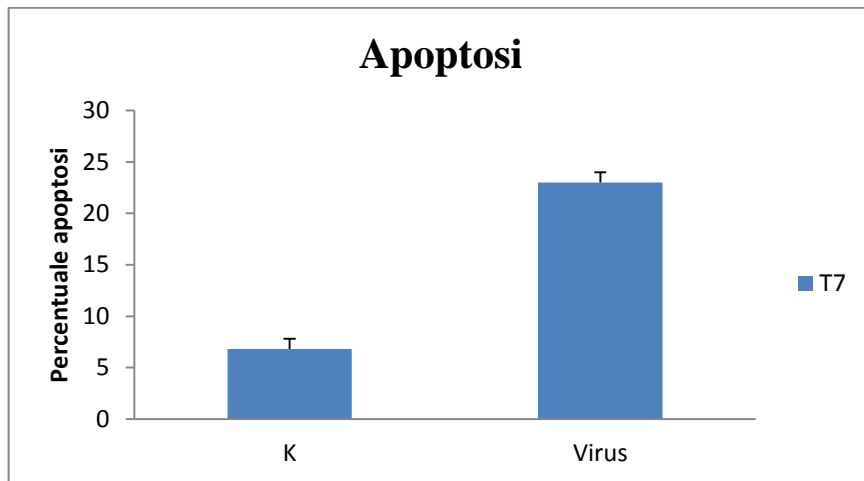


Figura 20: Percentuale di apoptosi nel campione di controllo e in quello trattato con il virus inattivato al calore e con gp120 ricombinante.

L'aumento di apoptosi è anche confermato dalla analisi del numero di cellule in coltura, mostrata nel grafico riportato di seguito (**Figura 21**). Le cellule non trattate hanno una crescita molto repentina intorno al settimo giorno, mentre quelle trattate con il virus rimangono numericamente inferiori e intorno al settimo giorno sono circa un terzo rispetto al controllo non trattato.

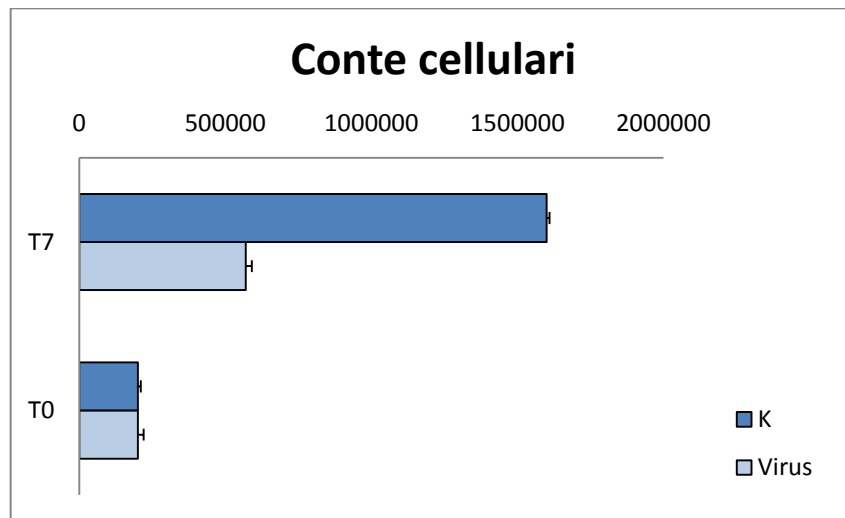
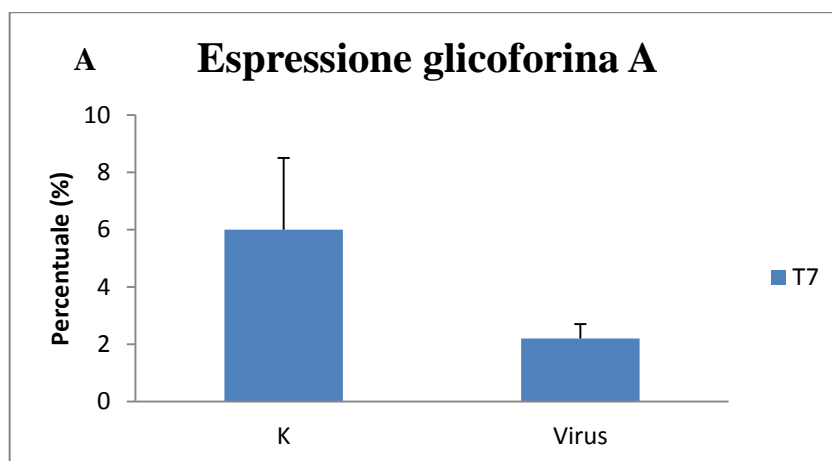


Figura 21: Conte cellulari nel campione di controllo e in quello trattato con il virus al T0 e dopo sette giorni dal trattamento.

4.2.2 Il trattamento con HIV-1 regola negativamente il differenziamento eritrocitario

Abbiamo studiato se HIV influenzi l'espressione di un classico marker di differenziamento eritocitario, la glicoforina A. E' stata valutata l'espressione proteica mediante citometria a flusso del mRNA mediante Real Time RT-PCR. Il campione trattato con il virus, a 7 giorni dal trattamento, presenta una ridotta espressione di glicoforina A, rispetto al controllo non trattato indicando un ridotto differenziamento. Nel campione di controllo infatti le cellule che esprimono tale marcatore sono il $6,2 \pm 2,5\%$, mentre solo il $3 \pm 0,5\%$ di quelle trattate con il virus risulta positivo. Questo dato è confermato anche dall'espressione del mRNA della glicoforina A: Nel campione di controllo dopo 7 giorni dal trattamento la sua espressione aumenta di $5,5 \pm 0,5$ volte rispetto al T2, mentre in presenza di virus l'espressione si mantiene sempre al di sotto del controllo sia dopo 2 sia dopo 7 giorni.



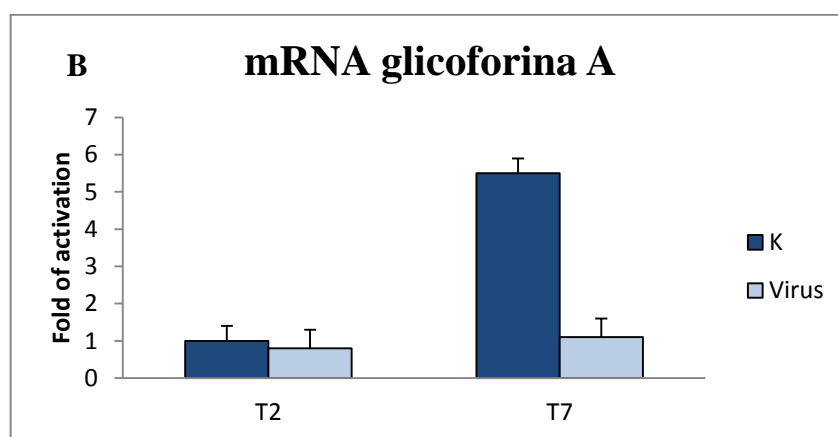


Figura 22: Espressione della glicoforina A ottenuta mediante citometria a flusso (A) ed espressione del mRNA della glicoforina A ottenuta mediante Real Time RT-PCR (B) nel campione trattato con il virus e in quello di controllo (K).

Per comprendere i meccanismi molecolari alla base di questi effetti biologici indotti da HIV, abbiamo successivamente analizzato l'espressione genica mediante qRT-PCR di fattori selezionati coinvolti in processi cellulari come il differenziamento e la proliferazione cellulare. Ci siamo concentrati in modo particolare sullo studio del TGF- β 1 e dell'IL-6, poiché tali citochine risultano alterate in diversi lavori. In particolare è stato evidenziato un aumento del mRNA del TGF- β 1 a 7 giorni dal trattamento nel campione trattato con il virus e un aumento del mRNA dell'IL-6 a 2 giorni dal trattamento (**Figura 23**).

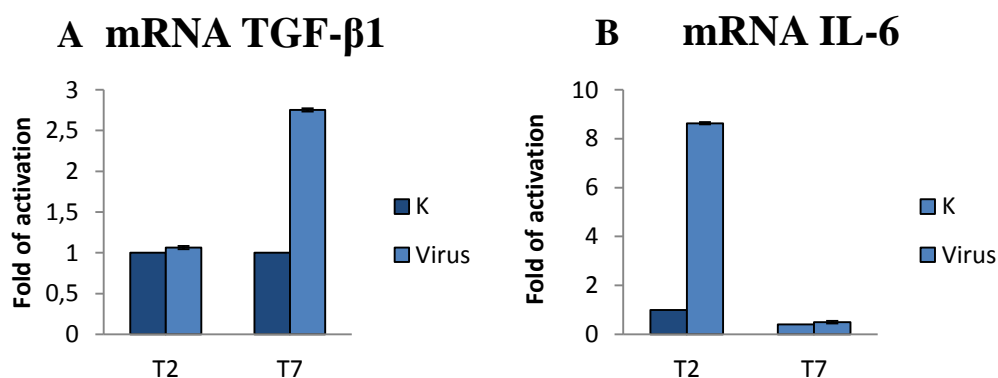


Figura 23: Espressione del mRNA del TGF- β 1 (A) e dell' IL-6 (B) ottenuta mediante Real Time RT-PCR nel campione di controllo e in quello trattato con il virus inattivato al calore.

Poiché il trattamento con il virus determina l'aumento dell'espressione dell'interleuchina 6 a livello delle cellule progenitrici indotte in differenziamento verso la linea eritrocitaria, si è deciso di indagare il ruolo di questa citochina e del suo promotore durante il contatto virus-cellula.

Abbiamo ottenuto dei costrutti del promotore dell'interleuchina 6 parzialmente deleti: il primo costrutto consta del promotore intero, il secondo presenta una delezione 575 nt, il terzo presenta una delezione di 1001 nt ed infine il quarto presenta una delezione di 1115 nt. Tali costrutti sono stati clonati a monte del gene CAT nel vettore pCAT e poi trasfettati nelle cellule progenitrici ematopoietiche. In particolare le cellule isolate da sangue condonale, vengono prima trasfettate con i diversi costrutti, trattate con il virus ed in seguito indotte in differenziamento verso la linea eritrocitaria.

La regione del promotore che abbiamo visto essere implicata in tale processo è quella compresa tra il nt -712 e il nt -286. Infatti le cellule trasfettate solo con i primi 2 costrutti presentano una up-regolazione del mRNA del gene CAT in presenza del virus.

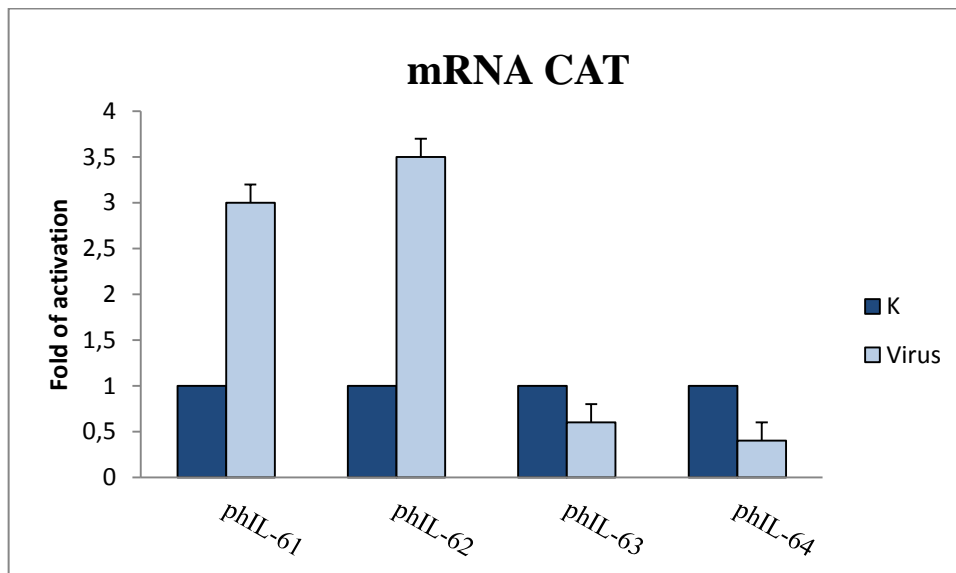


Figura 24: Espressione del mRNA del gene CAT in cellule progenitrici ematopoietiche trasfettate con i diversi costrutti in presenza di virus. Il costrutto 1 consta del promotore intero, il costrutto 2

presenta una delezione del promotore di 575 nt, il costrutto 3 presenta una delezione di 1001 nt, ed il costrutto 4 presenta una delezione di 1115 nt.

All'interno di questa regione sono presenti numerosi siti per fattori trascrizionali, che stiamo attualmente valutando nel dettaglio. Di seguito è riportata la sequenza del promotore e i siti ottenuti dall'analisi della sequenza mediante il software Jaspas Database. L'analisi con site-directed mutagenesis dovrebbe permettere di identificare i fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione positiva del promotore di IL-6.

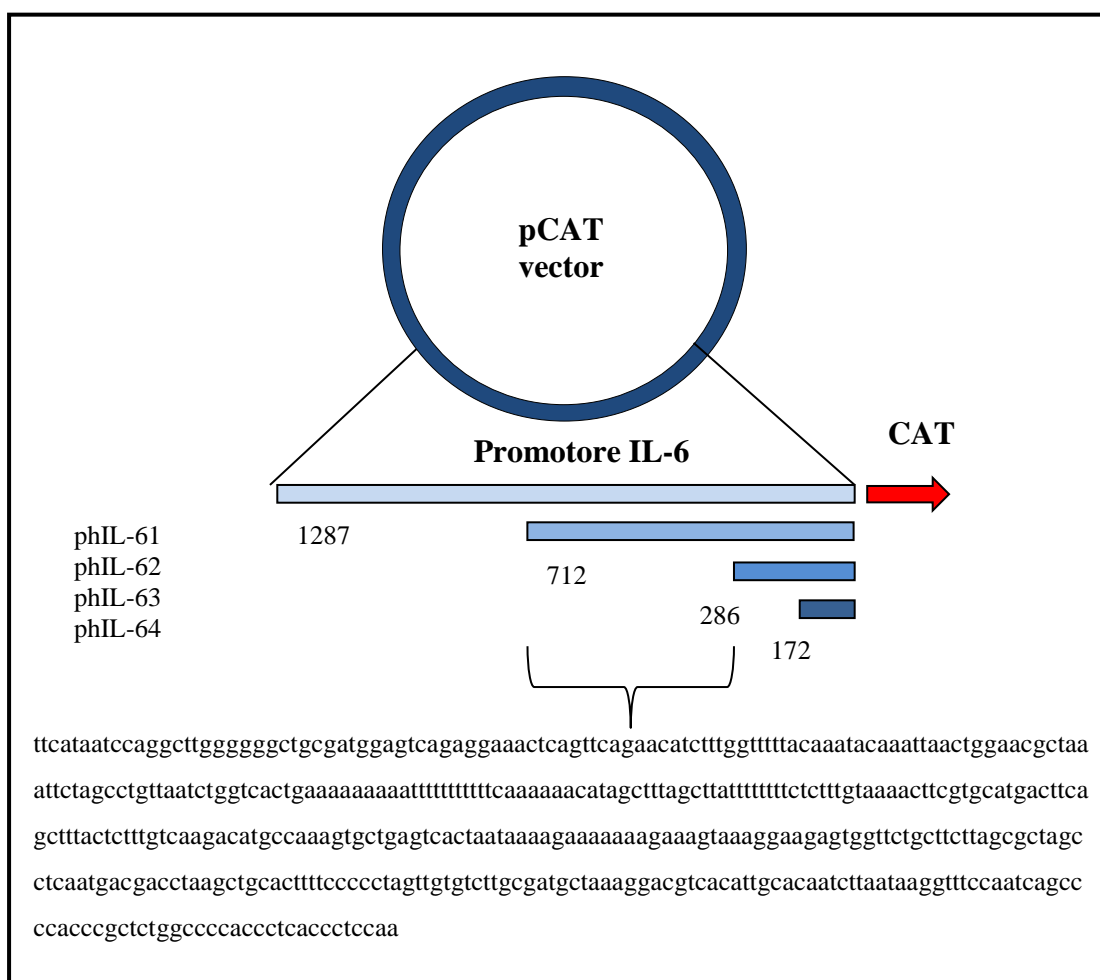


Figura 25: Rappresentazione schematica dei diversi costrutti del promotore dell'IL-6 e sequenza nucleotidica della regione attivata dal virus.

Nome	Score	Sequenza
SPIB	10.470	agaggaa
ETS1	7.633	tttct
Prrx2	9.124	aatta
SOX10	8.910	ctttgt
NFE2L1::MafG	8.812	catgac
SOX10	8.910	ctttgt
NFIC	9.697	tggca
NFE2L2	15.888	gtgactcagca
AP1	10.664	tgactca
ETS1	7.633	cttct
Klf4	15.246	agggtggggc
SOX10	8.910	ctttgt

Tabella 4: Siti trascrizionali presenti nella porzione del promotore dell'IL-6 implicata durante il trattamento con il virus.

Per valutare l'azione di IL-6 in questo contesto sperimentale abbiamo analizzato l'effetto dato dall'inibizione dell'IL-6 sull'espressione genica, sul ciclo cellulare e sul differenziamento. In particolare, come è mostrato di seguito (**Figura 26**), è stata per prima cosa valutata la percentuale di apoptosi e l'espressione della glicoforina A nel campione di controllo, in quello trattato con l'inibitore dell'IL-6, in quello trattato solo con il virus ed in quello trattato con l'inibitore dell'IL-6 e con il virus, dopo 7 giorni dal trattamento. Da studi presenti in letteratura sappiamo che livelli ridotti di IL-6 correlano con l'insorgenza dell'anemia [122] e che tale citochina agisca inibendo l'apoptosi in alcuni tipi cellulari.

Da questo studio è stato evidenziato come tale citochina abbia un effetto positivo sulla cellula progenitrice ematopoietica stimolando da un lato il differenziamento e dall'altro riducendo l'apoptosi. I grafici riportati di seguito evidenziano come l'inibizione di tale citochina mediante anticorpo neutralizzante determini un aumento dell'apoptosi ed una riduzione del differenziamento.

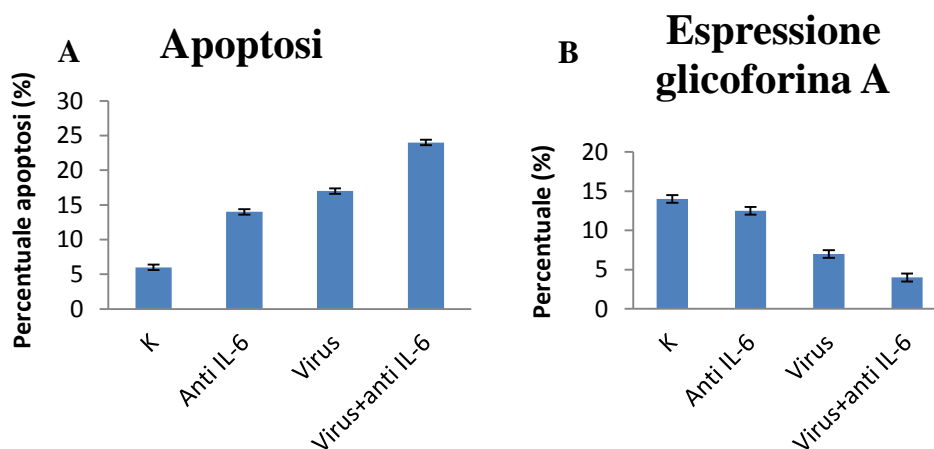


Figura 26: Percentuale di apoptosi (A) ed espressione della glicoforina A (B) nel campione di controllo, in quello trattato con anti IL-6, in quello trattato con il virus e in quello trattato con il virus e anti IL-6.

4.2.3 Il trattamento con il virus HIV-1 determina inizialmente un aumento della fase proliferativa e successivamente un aumento dell'apoptosi in HPCs trattate con EPO e poi con HIV

Il secondo protocollo è stato allestito con HPCs isolate da sangue cordonale, le quali sono state poste in coltura in terreno IMDM a cui è stato aggiunto FBS (2%), SCF (10ng/ml), IL-3 (10ng/ml), GM-CSF (250 ng/ml) ed EPO (4U/ml). Dopo 24 ore dall'aggiunta degli stimoli le cellule sono state trattate con HIV-1 IIIb e HIV-1 inattivato al calore e gp120 ricombinante.

I campioni trattati con il virus mostrano una percentuale maggiore di cellule apoptotiche rispetto al controllo non trattato. Tale aumento non è molto evidente nei primi giorni, ma si fa progressivamente più severo a partire dall'ottavo-decimo giorno dopo il trattamento. Infatti, a partire dall'ottavo giorno post-trattamento l'apoptosi nel campione trattato con il virus è pari al $23,5 \pm 1,5\%$, con un picco dopo 20 giorni in cui raggiunge il $26 \pm 2\%$, mentre nel controllo non trattato è in media pari al $7 \pm 3\%$.

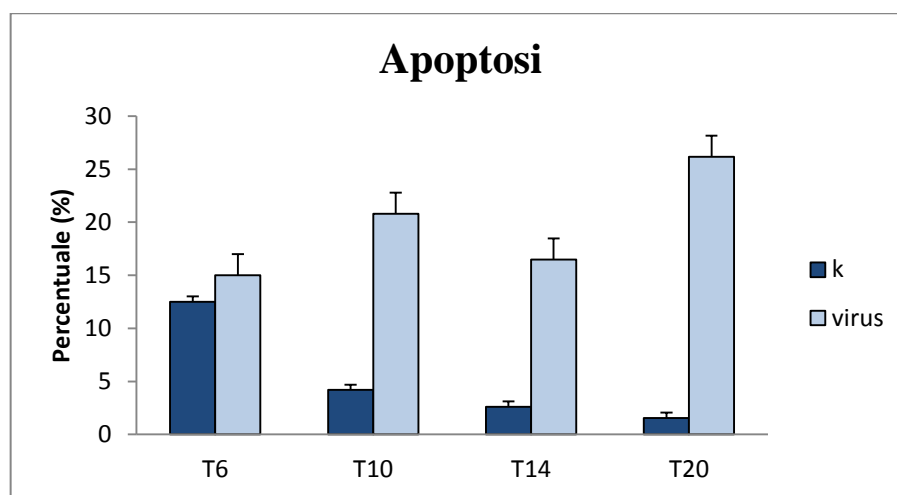


Figura 27: Percentuale di apoptosi nel campione di controllo e in quello trattato con il virus al T6, T10, T14 e T20.

Utilizzando quindi questo protocollo, che prevede l'induzione in differenziamento prima del trattamento con il virus, l'apoptosi si mantiene più bassa nei primi

giorni e poi aumenta progressivamente a partire dall'ottavo giorno post-trattamento. Utilizzando invece il protocollo inverso, quello mostrato nel paragrafo 4.2, ovvero trattando prima le cellule con il virus per 24 ore e poi inducendone il differenziamento, l'apoptosi è da subito più severa e già al settimo giorno le cellule sono quasi esclusivamente apoptotiche.

Oltre all'apoptosi sono state indagate le diverse fasi del ciclo cellulare. In particolare, le cellule trattate con il virus mostrano un aumento della fase S/G₂/M rispetto al controllo non trattato nei primi 5 giorni dall'aggiunta del virus, poi si verifica una riduzione. In particolare nel campione di controllo la fase S/G₂/M nel campione di controllo dopo 6, 9, 14 e 20 giorni è rispettivamente del 16,±2%, 14,5±1,6%, 13,88 ±1,1% e 9,24±0,9%. In presenza di virus invece dopo 6, 9, 14 e 20 giorni la percentuale di cellule in fase S/G₂/M è di 19,02±2%, 6,84±1,2%, 10,23±0,8% e 3,41±1% (p<0,05).

Abbiamo quindi una percentuale di cellule proliferanti maggiore nei primi giorni dal trattamento con il virus e poi si assiste ad un blocco e ad un consistente aumento dell'apoptosi.

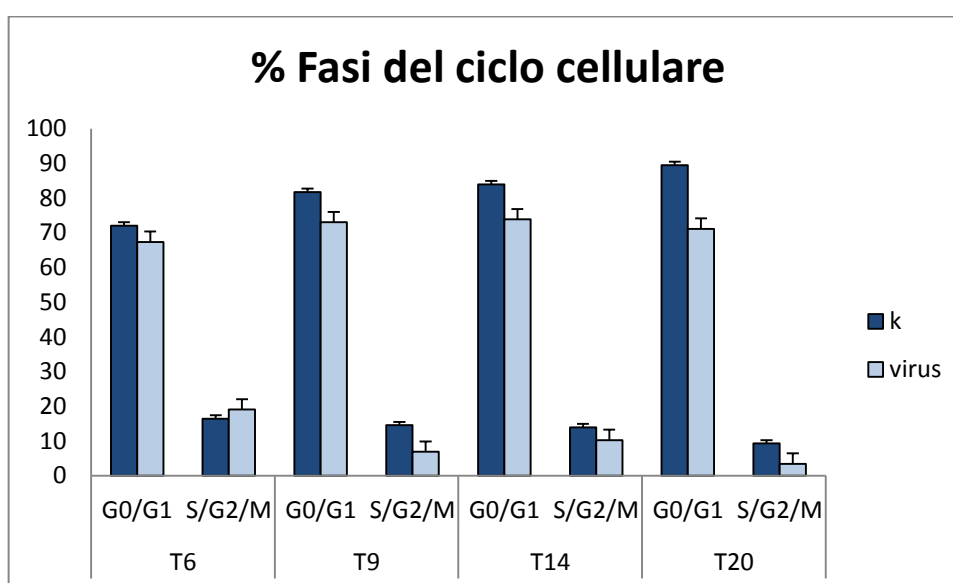


Figura 28: Percentuale delle fasi S/G₂/M e G/G1 al T6, T9, T14 e T20 nel campione di controllo (K) e in quello trattato con il virus.

Utilizzando questo protocollo, il ciclo cellulare segue un andamento peculiare differente da quello osservato e descritto per il protocollo precedente. Infatti, in questo caso, se le cellule vengono inizialmente indotte in differenziamento e successivamente trattate con il virus, si assiste in un primo momento all'aumento della fase proliferativa per i primi 5 giorni, dopo di che tale fase progressivamente si arresta e inizia ad aumentare l'apoptosi. Nel protocollo descritto precedentemente nel paragrafo 4.2.1, in cui le cellule subiscono inizialmente una incubazione per 24 ore con il virus e poi vengono indotte in differenziamento, si assiste ad un aumento progressivo della apoptosi che già a sette giorni colpisce quasi tutte le cellule.

Le conte cellulari confermano quello che si osserva dall'analisi delle diverse fasi del ciclo. In particolare nei primi 5 giorni abbiamo un numero di cellule maggiore nel campione trattato con il virus (cosa che viene confermata dalla percentuale di cellule in fase S/G2/M), mentre a partire dal sesto-settimo giorno post-trattamento cala progressivamente.

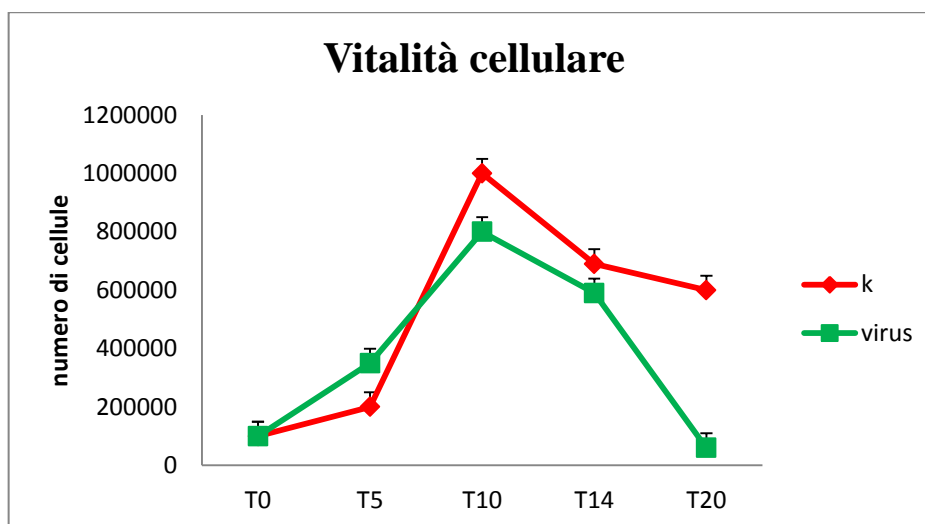


Figura 29: Conte cellulari del campione di controllo e di quello trattato con il virus al T0, T5, T10, T14 e T20.

Le colonie ottenute in terreno semi-solido di metilcellulosa appaiono numericamente maggiori in seguito al trattamento con il virus. Questo però non si

accompagna ad un numero maggiore di colonie differenziate; infatti esse appaiono più chiare rispetto a quelle presenti nel controllo, dopo 15 giorni.

Questo ci porta a pensare che il differenziamento sia inizialmente più rapido, cosa che per altro è confermata dagli studi sopra riportati, e che subisca poi un drastico arresto dovuto ad una inesorabile morte cellulare.

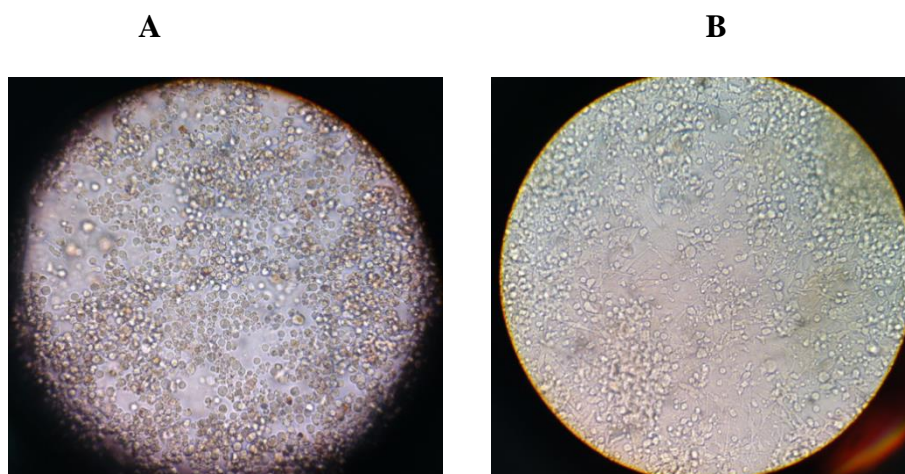


Figura 30: Colonie in terreno semi-solido nel campione di controllo (A) in quello trattato con il virus (B).

4.2.4 Il trattamento con HIV-1, successivamente all'induzione con EPO accelera il processo differenziativo

Abbiamo poi voluto indagare l'effetto del virus sul differenziamento, analizzando l'espressione della glicoforina A, marker differenziativo eritroide. L'espressione della glicoforina A è risultata maggiore nel campione trattato con il virus rispetto al controllo nei primi 5 giorni dalla messa in coltura, poi si assiste ad una riduzione. Nel controllo invece l'espressione aumenta con un picco a 10 giorni dalla stimolazione. In particolare, nel controllo non trattato l'espressione della glicoforina A dopo 5, 10 e 14 giorni è rispettivamente dell' $8,2\pm 0,5\%$, $23,3\pm 0,7\%$ e $14\pm 0,4\%$. In presenza di virus invece a 5 giorni post trattamento è del

13,5±0,4%, dopo 10 giorni è del 10,1±0,5% ed infine dopo 14 giorni è del 12,6±0,7%.

Il trattamento con il virus accelera quindi il processo differenziativo e proliferativo nei primi giorni, a cui segue una fase apoptotica che riduce drasticamente il numero di cellule.

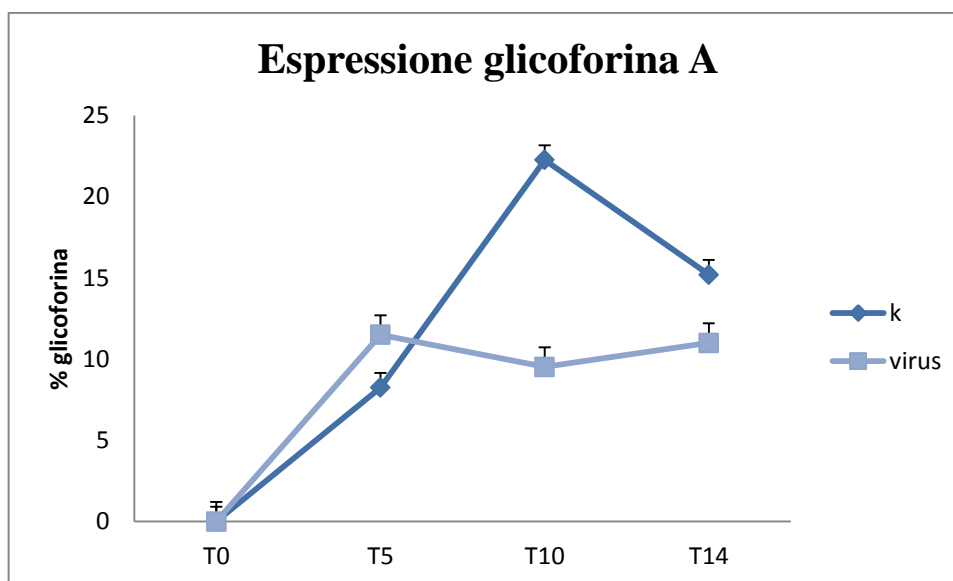


Figura 31: Percentuale di espressione della glicoforina A nel campione di controllo e in quello trattato con il virus al T0, T5, T10 e T14.

L'aumento dell'espressione della glicoforina A è confermato anche dall'aumento del mRNA della globina analizzato mediante q RT-PCR.

L'espressione della globina, infatti, nel campione di controllo aumenta progressivamente, con una forte accelerazione tra il settimo e il decimo giorno. Nel campione trattato con il virus l'espressione di tale gene ha un andamento differente: è inizialmente più alto rispetto al suo controllo non trattato e successivamente si riduce. Il campione di controllo mostra infatti una espressione di globina crescente (dopo 10 e 15 giorni aumenta rispettivamente di 9,12±1 e 9,78±0,6 volte rispetto al T₀), mentre il campione trattato con il virus presenta un aumento dell'espressione del mRNA della globina di 3,11±0,3 volte rispetto al controllo non trattato e poi si abbassa drasticamente .

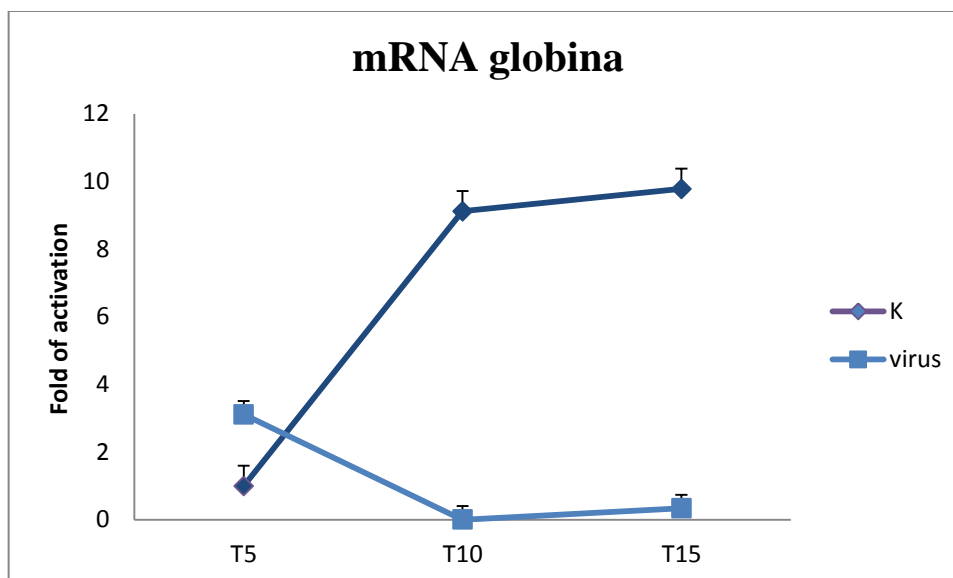


Grafico 32: Espressione del mRNA della globina nel campione di controllo e in quello trattato con il virus al T5, T10 e T15.

4.2.5 Il trattamento delle HPC con HIV-1 in seguito all'induzione da parte di EPO causa l'up-regolazione del mRNA del TGF- β 1 ma non dell'IL-6

Abbiamo dimostrato come il trattamento con il virus determini l'up-regolazione di alcuni geni ed in modo particolare ci siamo soffermati sullo studio del TGF- β 1 e dell'IL-6. I dati fino ad ora mostrati indicano che vi sia un consistente aumento dell'espressione del TGF- β 1 e dell'IL-6 in seguito al trattamento con il virus ed in particolare tali geni vengono up-regolati nel momento in cui le cellule HPC vengono inizialmente incubate con il virus per 24 ore e successivamente indotte in differenziamento mediante EPO verso la linea eritrocitaria. Utilizzando il protocollo contrario, ovvero inducendo prima le HPC a differenziare con EPO per 24 e successivamente trattandole con HIV-1, è presente una up-regolazione del TGF- β 1, ma non dell'IL-6. Infatti l'mRNA del TGF- β 1 in presenza di virus aumenta di $7 \pm 0,5$ volte rispetto al controllo non trattato dopo 4 giorni dal

trattamento, mentre l'mRNA dell'IL-6 si mantiene sempre al di sotto del valore di controllo.

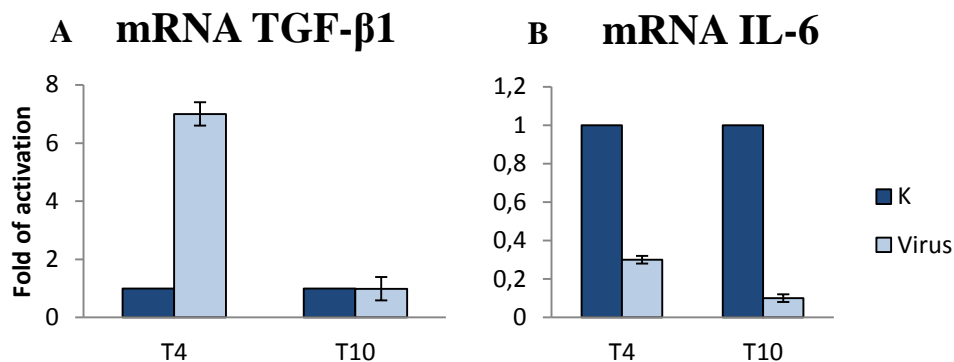


Grafico 33: Espressione del mRNA del TGF-β1 (A) e dell'IL-6 (B) nel campione di controllo e in quello trattato con il virus dopo 4 e 10 giorni dal trattamento con il virus.

4.2.6 Il legame gp120-CD4 è implicato nel processo apoptotico mentre il legame gp120-CXCR4 anche in quello differenziativo

Abbiamo già dimostrato che il legame di gp120 al recettore CD4 ed al corecettore CXCR4 è responsabile dell'induzione in apoptosi delle cellule HPC. Siamo quindi andati ad indagare se tale legame fosse implicato anche nel processo differenziativo. I dati seguenti mostrano come l'inibizione del recettore CD4 mediante P5P o sCD4 lasci invariata l'espressione della glicoforina A, mentre l'inibizione del corecettore CXCR4 da parte dell'AMD3100 porti all'aumento dell'espressione di tale antigene. L'espressione della glicoforina A dopo 5 e 10 giorni dal trattamento nel campione di controllo è rispettivamente del $8 \pm 0,6\%$ e $22,26 \pm 0,7\%$, in presenza di virus tale espressione è del $11,5 \pm 0,5\%$ e $9,52 \pm 0,5\%$, in presenza di P5P e virus è del $12 \pm 0,4\%$ e del $8 \pm 0,3$, mentre in presenza di AMD3100 e virus è pari al $6 \pm 0,5\%$ e al $14 \pm 0,5\%$.

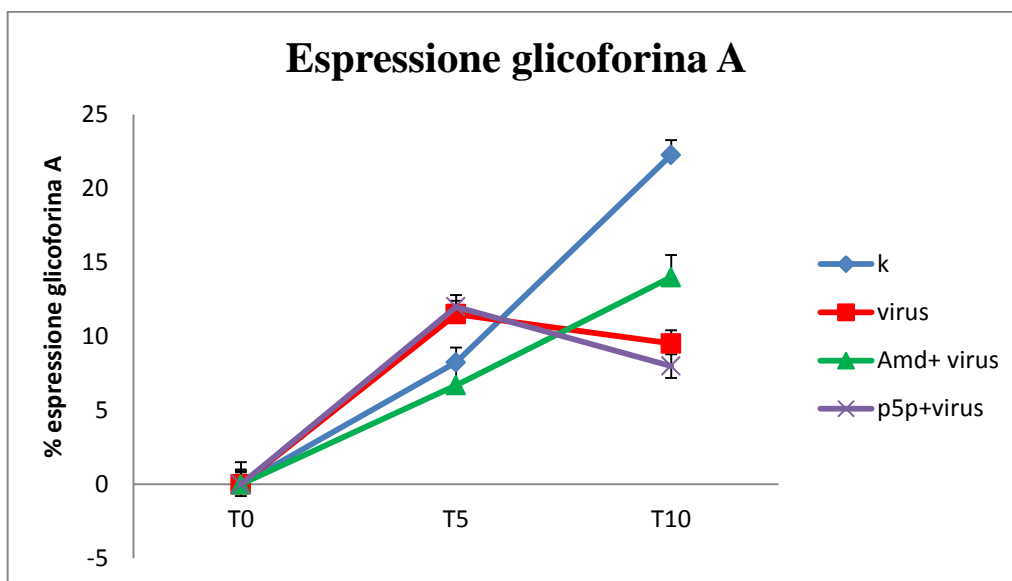


Grafico 34: Espressione della glicoforina A nel campione di controllo, in quello trattato con il virus, in quello trattato con il virus e con P5P ed in quello trattato con il virus e con AMD 3100 dopo 5 e 10 giorni dal trattamento.

4.2.7 L'up-regolazione del TGF- β 1 durante il differenziamento viene indotta dal legame gp120-CD4/CXCR4

Nei paragrafi precedenti è stato mostrato come il contatto del virus determini una up-regolazione dell'espressione di diversi geni ed in particolare del TGF- β 1. Abbiamo quindi indagato se tale espressione fosse dipendente dal legame di gp120 con il recettore CD4 o con il corecettore CXCR4. L'inibizione del recettore da parte del P5P o del sCD4 in presenza di virus determina una riduzione dell'espressione del TGF- β 1. In particolare dopo 4 giorni dal trattamento con il virus l'espressione del TGF- β 1 è superiore al controllo non trattato di $6,9 \pm 0,3$ volte, mentre in seguito al trattamento con l'inibitore del recettore e del corecettore ritorna al livello del controllo (**Figura 35**).

Possiamo quindi dire che l'apoptosi indotta dal virus sia TGF- β 1 mediata e dovuta al legame della glicoproteina di membrana con il CD4 e con il corecettore CXCR4.

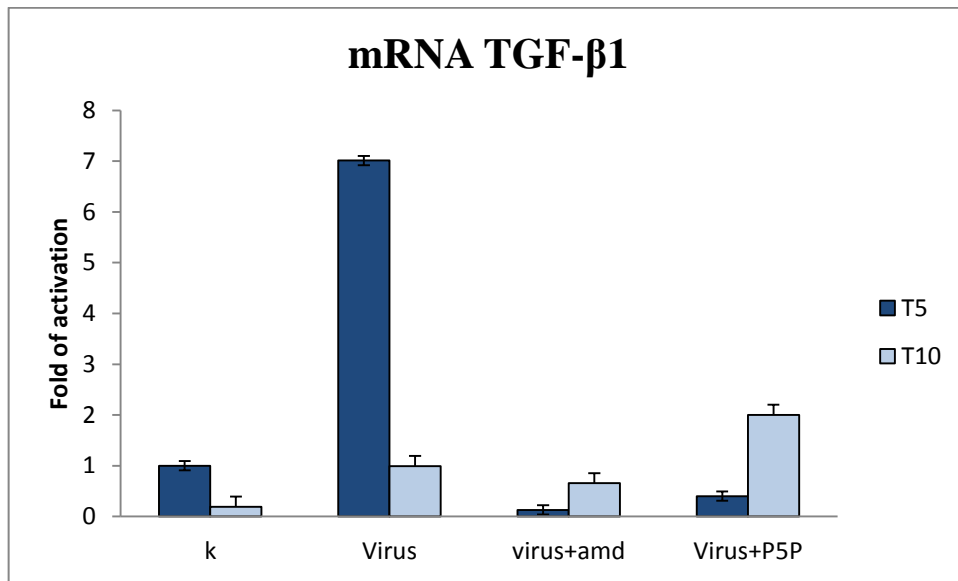


Grafico 35: Espressione del mRNA del TGFβ1 nel campione di controllo, in quello trattato con il virus, in quello trattato con il virus e con AMD3100 ed in quello trattato con il virus con P5P dopo 5 e 10 giorni dal trattamento.

5. Discussione e Conclusioni

L'infezione da HIV-1, si accompagna, oltre alla nota riduzione dei linfociti T CD4, ad anomalie che coinvolgono diversi organi e tessuti. I soggetti infetti da HIV presentano danni a livello dell'osso, del sistema cardiovascolare, renale e nervoso [65-67]. Patologie quali osteoporosi, aterosclerosi e demenza, che di norma interessano soggetti anziani, sono rilevabili in pazienti HIV positivi anche in soggetti di giovane età. Queste osservazioni cliniche hanno indotto a ritenere la patogenesi dell'infezione da HIV come molto più complessa e ad ampio spettro di quello che si riteneva sino ad alcuni anni fa. Inoltre, è ben noto come l'infezione da HIV si accompagni a citopenie del sangue periferico: la trombocitopenia rappresenta una delle prime manifestazioni ematologiche in corso dell'infezione da HIV, mentre anemia e neutropenia si manifestano nelle fasi più tardive [68-72].

L'anemia è una manifestazione clinica presente in molti pazienti affetti da HIV [73] e la sua incidenza è pari al 10 % in pazienti asintomatici e può arrivare fino al 92 % nei pazienti con AIDS. È interessante notare come il trattamento con cART ha ridotto l'insorgenza di questa citopenia nei pazienti affetti da HIV anche se diversi pazienti presentano ancora una anemia di vario grado dal meccanismo ancora oscuro. La comparsa di anemia, pur non determinando direttamente il decesso dei pazienti HIV positivi, viene tuttavia correlata con un più alto rischio di ridotta sopravvivenza rispetto ai pazienti HIV positivi non anemici. I sintomi dell'anemia durante l'infezione da HIV non sono differenti da quelli che si osservano nei pazienti HIV negativi, e la diagnosi è basata sull'osservazione di una riduzione del valore di emoglobina (Hb), e della conta degli eritrociti. L'anemia riscontrabile si attesta tra gli 8-14 g/dL negli uomini e 8-12 g/dL nelle

donne anche se è possibile riscontrare anemie più severe dipendenti dal contesto immunosoppressivo, dall'alterazione citochinica e dallo stadio della malattia.

Si ritiene che la patogenesi dell'anemia nei pazienti HIV-positivi possa essere considerata come multifattoriale: i diversi meccanismi che possono essere coinvolti nell'induzione dell'anemia coinvolgono da un lato la riduzione della produzione degli eritrociti, modificando la biologia delle cellule progenitrici ematopoietiche (HPCs), e dall'altro l'aumento della loro distruzione. Diversi possono essere i meccanismi alla base dell'anemia: per esempio, l'azione diretta del virus e delle sue proteine sul midollo osseo, l'alterazione dell'equilibrio delle citochine, la presenza di autoanticorpi diretti contro gli eritrociti o EPO e anche l'azione di alcuni antiretrovirali possono essere implicati a diverso titolo nella genesi dell'anemia. Il nostro studio si è interessato in modo specifico sull'analisi dell'azione di HIV sulle HPCs e lungo il differenziamento di queste cellule verso la filiera eritrocitaria. In particolare, come primo obiettivo, abbiamo analizzato, su un sistema cellulare rappresentato dalle HPCs purificate dal cordone ombelicale, se HIV fosse capace di infettare direttamente tali cellule. La possibilità che le HPCs possano essere considerate come un target diretto di infezione produttiva da HIV e come un possibile reservoir dell'infezione rappresenta un tema ancora molto controverso e non ancora risolto [97-100-109-110-111].

Le HPCs presentano i recettori e i co-recettori sulla propria membrana cellulare delle HPC: studi eseguiti mediante citometria a flusso hanno mostrato che il 25-65% di cellule CD34+ HPC di donatori sani esprime la proteina CD4, mentre le proteine CXCR4 e CCR5 sono espresse rispettivamente nel 53% e nel 35% delle HPCs. Tuttavia, l'espressione del CXCR4 e del CCR5 sembra dipendere in modo importante dalla fase del differenziamento [94-96]. L'espressione dei recettori e dei co-recettori sulle membrane delle HPCs suggerisce che queste cellule possano essere considerate un possibile bersaglio di infezione. I nostri risultati hanno mostrato che nelle condizioni sperimentali utilizzate, le HPCs da cordone ombelicale risultano essere resistenti all'infezione. Un'analisi a 7 giorni dall'infezione con due diversi ceppi di HIV-1 non ha mostrato né una produzione rilevabile di nuova progenie virale, né l'integrazione di DNA provirale nel

genoma cellulare. Nelle nostre condizioni sperimentali, quindi, le HPCs da cordone ombelicale non rappresentano un target di infezione e di replicazione virale suggerendo come altri meccanismi possano determinare un danno da HIV sulle HPCs. A seguito di questi dati, abbiamo analizzato se HIV potesse indurre l'attivazione dell'apoptosi e l'inibizione della proliferazione delle HPCs. L'apoptosi rappresenta un meccanismo già suggerito come una causa delle citopenie ematiche nell'infezione da HIV. L'apoptosi svolge un ruolo importante nella deplezione di linfociti T CD4+, anche attraverso l'interazione di gp120 di HIV e CD4. La gp120 di HIV è anche in grado di indurre l'attivazione dell'apoptosi nelle cellule endoteliali, osteoblasti, e neuroni [113]. Questa regolazione negativa della proliferazione e della sopravvivenza è stata associata con l'aumento della produzione del TGF- β 1 da parte delle HPCs e alla presenza di un meccanismo Fas-dipendente [114]. Questa riduzione nella sopravvivenza e proliferazione causata dall'apoptosi potrebbe spiegare almeno in parte la diminuzione delle cellule progenitrici e dei precursori circolanti, osservata nei pazienti HIV-positivi [115]. I nostri dati dimostrano come HIV-1, hiHIV-1 e rgp120 inducono l'attivazione dell'apoptosi nelle HPCs attraverso un circuito esocrino-paracrino indotto da citochine come TGF- β 1 con l'induzione di alcuni geni come GATA e TNF α . In particolare, HPCs dopo 3 giorni dal trattamento con HIV-1, hiHIV-1 e rgp120 presentano un significativo aumento della percentuale di apoptosi rispetto al controllo non trattato. L'apoptosi abbiamo visto essere TGF- β 1 dipendente, poiché, inibendo tale citochina mediante anticorpo neutralizzante o siRNA, la percentuale di apoptosi in presenza di virus ritorna al livello del controllo non trattato. Questi dati sostanzialmente confermano ciò che era già stato visto in passato anche su cellule progenitrici isolate da midollo osseo e sangue periferico di pazienti infetti [121]. E' stato inoltre studiato il promotore del TGF- β 1 per valutare la regione che viene interessata dal legame tra il virus e la cellula ospite.

Per fare questo sono stati costruiti dei plasmidi contenenti diverse parti del promotore del TGF- β 1 clonate a monte del gene reporter CAT e trasfettate in HPC. Queste cellule vengono poi trattate con il virus attivo, inattivato al calore e

gp120 ricombinate. La regione del promotore implicata durante l'interazione gp120-cellula ospite è quella compresa tra il nucleotide -1362 ed il nucleotide -1132. All'interno di questa regione sono presenti molteplici siti per diversi fattori trascrizionali, che attualmente stiamo valutando in dettaglio. La novità rilevante risiede nella dimostrazione che l'azione negativa esercitata dal virus trova origine nell'interazione tra gp120 con il recettore CD4, e con il corecettore CXCR4. Ci siamo concentrati in modo particolare sul recettore CXCR4 perché l'anemia si riscontra nella fase tardiva dell'infezione, la quale è di norma accompagnata da un tropismo virale X4. Inibendo il legame tra gp120 e il CD4 e il CXCR4, la percentuale di apoptosi in presenza di virus è simile a quella del controllo non trattato. Questo dimostra che un'alterazione HIV indotta della regolazione delle citochine e in particolare del TGF- β 1 gioca un ruolo centrale nella patogenesi dell'anemia HIV indotta. TGF- β 1 è un fattore coinvolto nella omeostasi delle HPCs la cui azione risiede nel mantenere un controllo del pool delle HPCs. Precedenti articoli hanno provato come il midollo osseo possa subire una disfunzione funzionale HIV indotta dovuta all'espressione del TGF- β 1 nei macrofagi midollari. Inoltre, il danno del differenziamento eritroide potrebbe essere correlato a danni a livello del microambiente midollare e alla riduzione delle cellule stromali. IL- 1β , IFN- γ , TGF- β 1 e TNF- α sono in grado di ridurre la crescita delle cellule progenitrici in vitro e possono svolgere un ruolo importante nell'induzione di anemia associata ad HIV. Alcuni lavori hanno suggerito che l'HIV possa compromettere i meccanismi di feedback EPO-correlati che regolano l'omeostasi dei globuli rossi. La riduzione della concentrazione di Hb induce la produzione di EPO, mentre in molti pazienti con HIV la presenza di anemia è associata ad una diminuzione della concentrazione sierica di EPO, che risulta indipendente dal danno renale. Inoltre, diversi esperimenti in vitro hanno dimostrato che il virus determina una riduzione della sintesi di EPO. Diversi meccanismi sono stati considerati per spiegare questa riduzione di EPO [78-82]. L'up-regolazione delle citochine pro-infiammatorie (IL- 1β e TNF- α) down-regola negativamente l'espressione di EPO in vitro, attraverso la formazione di specie reattive dell'ossigeno, che a loro volta danneggiano l'affinità di legame dell'

EPO. Inoltre, gli anticorpi circolanti anti-EPO sono rilevabili in circa il 23 % dei pazienti affetti da HIV, e uno studio prospettico su 113 pazienti ha mostrato che gli anticorpi anti-EPO potrebbe essere considerati un fattore di rischio indipendente per l'anemia [83-85]. Recenti studi hanno dimostrato che gli anticorpi anti-EPO riconoscono principalmente tre epitopi dell'EPO che si estendono su tre regioni, tra cui i domini amminoacidi 1-20 (EP1), 54-72 (EP5) e 147-166 (EP12), di cui EP1 e EP12 sono i domini che sono coinvolti nell'interazione EPO - EPOR. La regione corrispondente alla EP1 mostra una omologia di sequenza del 63% con la sequenza amminoacidica di p17 di HIV. L'anemia associata ad HIV potrebbe anche essere indotta da emolisi. Sebbene l'emolisi costante è rara nei pazienti con HIV, il danno e la lisi dei globuli rossi da auto-anticorpi possono essere considerate un ulteriore meccanismo di anemia associata ad HIV.

Il coinvolgimento delle HPC da parte del virus potrebbe però essere accompagnato anche dall'alterazione di tali cellule durante il loro differenziamento verso la filiera eritrocitarie. La coespressione del recettore CD4 e della glicoforina A indica che alcune cellule in differenziamento verso la linea eritroide potrebbero rappresentare un target per l'infezione da HIV [75]. Inoltre, è stata dimostrata anche l'espressione di CXCR4 in CD34+ BFU, anche se il livello di espressione di tale corecettore diminuisce durante il differenziamento eritroide. Si è quindi studiato l'impatto di HIV su HPCs differenziate mediante EPO verso la linea eritrocitaria mediante due protocolli sperimentali. Nel primo protocollo, le cellule progenitrici ematopoietiche, dopo essere state isolate da sangue cordonale, vengono trattate per 24 ore con il virus attivo, inattivato al calore e con gp120 ricombinante e successivamente vengono indotte in differenziamento mediante EPO. Nel secondo protocollo sperimentale, invece, le HPC, dopo essere state separate anch'esse da sangue cordonale, vengono indotte prima in differenziamento per 24 ore con EPO e successivamente trattate con il virus.

Le cellule che subiscono il primo trattamento, ovvero che sono soggette ad un iniziale priming negativo operato dal virus, vanno incontro ad apoptosi più rapidamente di quelle che subiscono il secondo trattamento. Tali cellule infatti già

dopo 7 giorni dal trattamento con il virus presentano una apoptosi che interessa quasi tutte le HPC. Le stesse cellule, sottoposte al secondo protocollo sperimentale si comportano invece in maniera differente: nei primi 5 giorni dal trattamento con il virus la percentuale di cellule apoptotiche è quasi irrilevante ed è maggiore la percentuale di cellule in fase S/G2/M; dopo 7 giorni inizia ad aumentare la fase apoptotica che progressivamente si inasprisce, con un picco a 20 giorni dal trattamento con il virus.

Possiamo quindi affermare che se HPCs vengono inizialmente a contatto con il virus, prima di essere indotte al differenziamento, si assiste ad una morte cellulare molto più repentina; se invece le stesse cellule prima del trattamento con HIV-1 vengono poste in coltura con eritropoietina, presentano inizialmente un aumento della proliferazione nei primi 5 giorni post-trattamento, che poi si arresta e lascia spazio all'apoptosi. Con entrambi i protocolli però, anche se con tempistiche diverse, l'effetto finale provocato dal virus è un aumento della morte cellulare programmata.

Il trattamento con il virus determina anche delle anomalie a livello del differenziamento verso la linea eritrocitaria. Le HPCs che subiscono un priming iniziale negativo da parte del virus, presentano a 7 giorni dal trattamento una riduzione della glicoforina A, marker differenziativo eritroide. Le stesse cellule se vengono prima messe in coltura con EPO e successivamente trattate con il virus, presentano nei primi 5 giorni post-trattamento un aumento dell'espressione della glicoforina A, la quale poi si riduce al di sotto del valore di controllo. In entrambi i protocolli, sebbene con tempistiche differenti, l'effetto finale dato dal virus è di riduzione del numero di cellule terminalmente differenziate. Questo è stato confermato non solo dall'analisi dell'espressione della glicoforina A, globina e CD71, ma anche dalla morfologia dalle colonie BFU-E e CFU-E presenti in terreno semi-solido di metilcellulosa. Con il secondo protocollo, le HPCs sono indotte da HIV-1 verso un più rapido differenziamento che diminuisce i cicli di amplificazione della replicazione cellulare con una riduzione del numero di cellule totali che viene poi a essere ancora più evidente dall'attivazione dell'apoptosi a tempi tardivi dall'induzione del differenziamento.

Utilizzando il primo protocollo, quello che prevede una iniziale incubazione delle cellule con il virus, prima dell'induzione in differenziamento, si ha una alterazione significativa in particolare del TGF- β 1 e della IL-6. Abbiamo indagato in modo particolare questi geni vista l'attivazione di TGF- β 1 nelle HPCs virus-indotta ed anche un aumento della IL-6 nei pazienti infetti [121]. L'espressione aumentata di IL-6 è rilevabile nei primi giorni post-esposizione al virus mentre TGF- β 1 aumenta in tempi tardivi quando invece IL-6 non risulta regolato positivamente. Abbiamo anche studiato il promotore della IL-6 per determinare la regione implicata durante il contatto virus-cellula ed indagarne i siti trascrizionali presenti. Per fare questo le diverse parti del promotore sono state clonate a monte del gene CAT ed i diversi costrutti sono stati trasfettati a livello delle HPC. La regione attivata durante il trattamento con il virus è quella compresa tra il nucleotide -712 e il -286. Attualmente stiamo ancora valutando in dettaglio i siti presenti in questa regione. In altri sistemi cellulari come i macrofagi, IL-6 regola TGF- β 1 in presenza di Tat. Nelle HPCs trattate con il primo protocollo gli esperimenti con anti-IL6, mostrano che IL-6 possiede un effetto protettivo per la vitalità cellulare e non sembra essere in diretta relazione con l'aumento successivo di TGF- β 1 anche se successive analisi saranno necessari per comprendere se possa esistere una correlazione tra i due fattori.

Se le HPCs invece vengono sottoposte al secondo protocollo, che prevede una iniziale induzione in differenziamento, seguita dal trattamento con il virus, presentano attivazione del TGF- β 1 sin dai tempi precoci e regolazione negativa del IL-6 con un accelerazione del differenziamento con una riduzione dei cicli proliferativi. Questo comporta un calo del numero assoluto di cellule differenziate verso la filiera eritrocitaria. L'analisi dell'interazione gp120/CXCR4 ha indicato come l'alterazione del differenziamento eritrocitario sia in relazione particolare con il legame tra questi fattori. La glicoforina A, infatti, ritorna a livelli vicini al controllo quando l'inibitore dell'interazione gp120/CXCR4, AMD3100, viene posto in coltura. Nel secondo protocollo, quindi abbiamo una complessa serie di

eventi che, attraverso l'inappropriata induzione di TGF- β 1, può determinare la riduzione del numero degli eritrociti.

Questo studio, ha quindi valutato, su HPCs di cordone ombelicale, alcuni controversi temi della patogenesi delle citopenie periferiche in corso di infezione da HIV. Nonostante ci siano indicazioni e studi contrastanti in merito, soprattutto su modelli di HPCs isolate dal midollo osseo, il nostro studio ha mostrato, in accordo con diversi articoli del passato, come le HPCs siano resistenti all'infezione. Inoltre, l'induzione di apoptosi nelle HPCs, mediata dall'interazione di gp120 con CD4 e CXCR4 e sintesi di TGF- β 1, rappresenta un meccanismo importante che contribuisce alla genesi delle citopenie ematiche. L'apoptosi rappresenta un meccanismo essenziale nelle citopenie HIV mediate infatti gp120 induce apoptosi anche in sistemi linfocitari, in cellule nervose, in osteoblasti con conseguenti alterazione dell'omeostasi di questi tessuti. Tale meccanismo era già stato anche descritto per lo sviluppo di trombocitopenie nei pazienti HIV positivi. L'azione della gp120 su CXCR4 nell'induzione di TGF- β 1 e dell'apoptosi rappresenta una originale osservazione che induce a pensare come l'interazione tra gp120 e questo co-recettore giochi un ruolo importante nella patogenesi da HIV. Questa interazione è stata individuata come biologicamente significativa anche in altri sistemi cellulari dimostrando ancora una volta la versatilità di HIV nell'indurre complessi meccanismi di danno cellulare.

Nella seconda parte dello studio abbiamo studiato l'effetto negativo del virus o e della gp120 durante le varie fasi del differenziamento eritroide. I risultati sono interessanti perché dimostrano come a seconda dell'ordine di interazione di HIV e di EPO sulla HPCs abbiamo due differenti risposte che pur essendo per certi versi contrastanti portano in modo proprio verso una comune inibizione del corretto differenziamento. L'interazione con HIV antecedente il trattamento con EPO ci presenta una azione complessa di induzione di apoptosi, inibizione della proliferazione e inibizione del differenziamento che contrasta l'azione differenziativa di EPO con la riduzione di numero e di qualità degli eritrociti. Sorprendentemente, se la cellula HPC viene a contatto con HIV successivamente al trattamento iniziale con EPO abbiamo la comparsa di un effetto biologico

particolare dove abbiamo un effetto differenziativo marcato nelle fasi precoci che potrebbe comportare una riduzione dei cicli replicativi normali delle cellule in via di differenziamento e una induzione di apoptosi e di inibizione successiva dei marker differenziativi nelle fasi terminali della differenziazione. L'induzione di un effetto differenziativo precoce è stato già rilevato in parte in studi su HPCs di midollo osseo trattate con EPO e TGF- β 1 confermando così questo aspetto specifico dei nostri risultati.

L'insieme dei nostri risultati dimostra come l'anemia dei pazienti HIV infetti possa avere una genesi che può essere spiegata anche dall'azione di gp120 e di HIV su HPCs e sulla loro differenziazione. I meccanismi indicati possono anche spiegare almeno in parte come il trattamento con EPO possa contrastare parzialmente l'anemia HIV indotta e come il controllo dell'espressione di TGF beta possa rappresentare un possibile target terapeutico. Successivi studi saranno poi indicati per comprendere in modo ancora più approfondito dal punto di vista molecolare lo sviluppo dell'anemia cercando di unire in un unico modello esplicativo l'azione di HIV sulle HPC e sul differenziamento con i danni a livello eritrocitario di tipo autoimmunitario.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Principi di microbiologia Medica, La Placa, dodicesima edizione, società editrice Esculapio
2. M. Xhilaga, R. Oelrichs, Basic HIV virology
3. Craig Wilen, John Tilton, Robert Doms, 2012. HIV: Cell Binding and Entry, Cold Spring Harb Perspect Med, April 2012
4. Davide Gibellini, Alberto Clò, Silvia Morini, Anna Misericchi, Cristina Ponti, Maria Carla Re: The effects of HIV on the erythrocyte and megakaryocyte lineages, World J Virol. 2013 May 12; 2(2):91-101
5. Jay A. Levy, HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges, AIDS 2009, 23:147-160
6. Weber, The pathogenesis of HIV-1 infection, British Medical Bulletin 2001, 58: 61-72
7. Supplemento del Notiziario dell'Istituto superiore di Sanità, Volume 26 - Numero 9, Supplemento 1 – 2013
8. Borsetti A, Parolin C, Ridolfi B, Sernicola L, Geraci A, Ensoli B, et al. CD4-independent infection of two CD4(-)/CCR5(-)/CXCR4(+) pre-T-cell lines by human and simian immunodeficiency viruses. J Virol 2000;74(14):6689-94.
9. Saha K, Zhang J, Gupta A, Dave R, Yimen M, Zerhouni B. Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor. Nat Med 2001;7(1):65-72.
10. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. Cell 1996;85(7):1149-58.
11. Zhang L, He T, Huang Y, Chen Z, Guo Y, Wu S, et al. Chemokine coreceptor usage by diverse primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. J Virol 1998;72(11):9307-12.

12. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 1998;4(11):1302-7.
13. Robertson D. US FDA approves new class of HIV therapeutics. *Nat Biotechnol* 2003;21(5):470-1.
14. Este JA, Telenti A. HIV entry inhibitors. *Lancet* 2007;370(9581):81-8.
15. Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, et al. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 1998; 280(5371):1949-53.
16. Hoffman NG, Seillier-Moisewitsch F, Ahn J, Walker JM, Swanstrom R. Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop. *J Virol* 2002 ;76(8):3852-64.
17. Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(18):9825-30.
18. Fouchier RA, Malim MH. Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes. *Adv Virus Res* 1999;52:275-99.
19. Bushman FD, Fujiwara T, Craigie R. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* 1990;249(4976):1555-8.
20. Nekhai S, Jeang KT. Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future Microbio* 2006;1:417-26.
21. Cohen EA, Dehni G, Sodroski JG, Haseltine WA. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol* 1990;64(6):3097-9.
22. Bieniasz PD. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* 2006;344(1):55-63.
23. Strebel K, Klimkait T, Martin MA. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* 1988;241(4870):1221-3.

24. Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 2008;451(7177):425-30.
25. Berry N, Ariyoshi K, Jaffar S, Sabally S, Corrah T, Tedder R, et al. Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol* 1998;1(7):457-68.
26. Kumar S. India has the largest number of people infected with HIV. *Lancet* 1999;353:48.
27. Downie JC, Dwyer DE, Kazazi F, Chew CB, Dowton DN, Randle C, et al. Identification of infection of an Australian resident with the human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2). *Med J Aust* 1992;157(6):415-7.
28. Damond F, Apetrei C, Robertson DL, Souquiere S, Lepretre A, Matheron S, et al. Variability of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infecting patients living in France. *Virology* 2001;280(1):19-30.
29. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* 1999;397(6718):436-41.
30. Ariyoshi K, Jaffar S, Alabi AS, Berry N, Schim van der Loeff M, Sabally S, et al. Plasma RNA viral load predicts the rate of CD4 T cell decline and death in HIV-2-infected patients in West Africa. *AIDS* 2000;14(4):339-44.
31. Berry N, Ariyoshi K, Balfe P, Tedder R, Whittle H. Sequence specificity of the human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) long terminal repeat u3 region in vivo allows subtyping of the principal HIV-2 viral subtypes a and b. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17(3):263-7.
32. Dittmar M, Clapham P, Weber J et al. Langerhans cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 subtype A through F isolates derived from different transmission groups. *J Virol* 1997; 71: 8008–13
33. Geijtenbeek T, Kwon D, Torensma R et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100: 587–97

34. Mellors J, Rinaldo C, Gupta P et al. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272:1167–70
35. Cheingsong-Popov R, Pangliotidi , Weber J et al. Humoral immune response to HIV antigens at seroconversion define outcome of HIV infection. *BMJ* 1991; 302: 23-26
36. Phillips A. Reduction of HIV concentration during acute infection: independence from a specific immune response. *Science* 1996; 271: 497–9
37. Ho D, Neumann A, Perelson A et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123–6
38. Wei X, Ghosh S, Taylor M et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373: 117–22
39. Wolthers K, Wisman G, Otto S et al. T cell telomere length in HIV-1 infection: No evidence for increased CD4+ T cell turnover. *Science* 1996; 274: 1543–7
40. Fouchier R, Groenink M, Koostra N et al. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp20 molecule. *J Virol* 1992; 66: 3183–7
41. Schuitemaker H, Koostra N, Koot M et al. Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium- inducing ability in primary T-cell culture. *J Virol* 1991; 65: 356–63
42. Schuitemaker H. Biological properties of HIV-1 and their relevance for AIDS pathogenesis. (Chapter 3) In: Dalglish A, Weiss R. (eds) *HIV and the New Viruses*, 2nd edn. London: Academic Press, 1999; 43–58
43. PiatakMJr, SaagMS, YangLC, ClarkSJ, KappesJC, LukKC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259: 1749–1754.

44. Bailey J, Blankson JN, Wind-Rotolo M, Siliciano RF. 2004. Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Curr Opin Immunol* 16: 470–476.
45. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61: 213–222.
46. Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, Stevenson M. 1991. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 254: 423–427.
47. Zhou Y, Zhang H, Siliciano JD, Siliciano RF. 2005. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 decay following entry into resting CD4 T cells. *J Virol* 79: 2199–2210
48. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373: 117–122.
49. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373: 123–126.
50. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, Richman DD, Valentine FT, Jonas L, Meibohm A, et al. 1997. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 337: 734–739.
51. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, Eron JJ Jr, Feinberg JE, Balfour HH Jr, Deyton LR, et al. 1997. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 337: 725–733.

52. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, Markowitz M, Ho DD. 1997. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 387: 188–191.
53. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS. 1997b. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci* 94: 13193–13197.
54. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, 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.
55. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD. 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278: 1291–1295.
56. Bailey JR, Sedaghat AR, Kieffer T, Brennan T, Lee PK, Wind-Rotolo M, Haggerty CM, Kamireddi AR, Liu Y, Lee J, et al. 2006. Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4⁺T cells. *J Virol* 80: 6441–6457.
57. Ruff CT, Ray SC, Kwon P, Zinn R, Pendleton A, Hutton N, Ashworth R, Gange S, Quinn TC, Siliciano RF, et al. 2002. Persistence of wild-type virus and lack of temporal structure in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in pediatric patients with extensive antiretroviral exposure. *J Virol* 76: 9481–9492.
58. Nickle DC, Jensen MA, Shriner D, Brodie SJ, Frenkel LM, Mittler JE, Mullins JI. 2003. Evolutionary indicators of human immunodeficiency virus type 1 reservoirs and compartments. *J Virol* 77: 5540–5546.
59. Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, Kaplan MH, Gallo RC, Popovic M. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233: 215–219.

60. Igarashi T, Brown CR, Endo Y, Buckler-White A, Plishka R, Bischofberger N, Hirsch V, Martin MA. 2001. Macrophages are the principal reservoir and sustain high virus loads in rhesus macaques after the depletion of CD4+T cells by a highly pathogenic simian immunodeficiency virus/HIV type 1 chimera (SHIV): Implications for HIV-1 infections of humans. *Proc Natl Acad Sci* 98: 658–663.
61. Zhu T, Muthui D, Holte S, Nickle D, Feng F, Brodie S, Hwangbo Y, Mullins JI, Corey L. 2002. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14+ monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 76: 707–716.
62. Arfi V, Riviere L, Jarrosson-Wuilleme L, Goujon C, Rigal D, Darlix JL, Cimarelli A. 2008. Characterization of the early steps of infection of primary blood monocytes by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 82: 6557–6565.
63. Gras G, Kaul M. 2010. Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection. *Retrovirology* 7: 30.
64. Carter CC, Onafuwa-Nuga A, McNamara LA, Riddell J IV, Bixby D, Savona MR, Collins KL. 2010. HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat Med* 16: 446–451.
65. Levy JA. HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges. *AIDS* 2009; 23: 147-160 [PMID: 19098484 DOI: 10.1097/QAD.0b013e3283217f9f]
66. Borderi M, Gibellini D, Vescini F, De Crignis E, Cimatti L, Biagetti C, Tampellini L, Re MC. Metabolic bone disease in HIV infection. *AIDS* 2009; 23: 1297-1310 [PMID: 19550284 DOI: 10.1097/QAD.0b013e32832ce85a]
67. Kaul M, Lipton SA. Mechanisms of neuronal injury and death in HIV-1 associated dementia. *Curr HIV Res* 2006; 4: 307-318 [PMID: 16842083 DOI: 10.2174/15701620677709384]

68. Zon LI, Arkin C, Groopman JE. Haematologic manifestations of the human immune deficiency virus (HIV). *Br J Haematol* 1987; 66: 251-256
69. Moses A, Nelson J, Bagby GC. The influence of human immunodeficiency virus-1 on hematopoiesis. *Blood* 1998; 91: 1479-1495
70. Ratner L. Human immunodeficiency virus-associated autoimmune thrombocytopenic purpura: a review. *Am J Med* 1989; 86: 194-198
71. Davis BR, Zauli G. Effect of human immunodeficiency virus infection on haematopoiesis. *Baillieres Clin Haematol* 1995; 8: 113-130
72. Alexaki A, Wigdahl B. HIV-1 infection of bone marrow hematopoietic progenitor cells and their role in trafficking and viral dissemination. *PLoS Pathog* 2008;
73. Kreuzer KA, Rockstroh JK. Pathogenesis and pathophysiology of anemia in HIV infection. *Ann Hematol* 1997; 75: 179-187
74. Mocroft A, Kirk O, Barton SE, Dietrich M, Proenca R, Colebunders R, Pradier C, dArminio Monforte A, Ledergerber B, Lundgren JD. Anaemia is an independent predictive marker for clinical prognosis in HIV-infected patients from across Europe. EuroSIDA study group. *AIDS* 1999; 13: 943-950
75. Cleveland RP, Liu YC. CD4 Expression by erythroid precursor cells in human bone marrow. *Blood* 1996; 87: 2275-2282
76. Gibellini D, Re MC, Vitone F, Rizzo N, Maldini C, La Placa M, Zauli G. Selective up-regulation of functional CXCR4
77. expression in erythroid cells by HIV-1 Tat protein. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 428-435
78. Watanabe D, Uehira T, Yonemoto H, Bando H, Ogawa Y, Yajima K, Taniguchi T, Kasai D, Nishida Y, Shirasaka T. Sustained high levels of serum interferon- γ during HIV-1 infection: a specific trend different from other cytokines. *Viral Immunol* 2010; 23: 619-625
79. Camacho J, Poveda F, Zamorano AF, Valencia ME, Vázquez JJ, Arnalich F. Serum erythropoietin levels in anaemic patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *Br J Haematol* 1992; 82: 608-614

80. Kreuzer KA, Rockstroh JK, Jelkmann W, Theisen A, Spen- gler U, Sauerbruch T. Inadequate erythropoietin response to anaemia in HIV patients: relationship to serum levels of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and their soluble receptors. *Br J Haematol* 1997; 96: 235-239
81. Wang Z, Goldberg MA, Scadden DT. HIV-1 suppresses erythropoietin production in vitro. *Exp Hematol* 1993; 21: 683-688
82. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1011-1023
83. Sipsas NV, Kokori SI, Ioannidis JP, Kyriaki D, Tzioufas AG, Kordossis T. Circulating autoantibodies to erythropoietin are associated with human immunodeficiency virus type 1-related anemia. *J Infect Dis* 1999; 180: 2044-2047
84. Tsiakalos A, Kordossis T, Ziakas PD, Kontos AN, Kyriaki D, Sipsas NV. Circulating antibodies to endogenous erythropoietin and risk for HIV-1-related anemia. *J Infect* 2010; 60: 238-243
85. Tsiakalos A, Routsias JG, Kordossis T, Moutsopoulos HM, Tzioufas AG, Sipsas NV. Fine epitope specificity of anti- erythropoietin antibodies reveals molecular mimicry with HIV-1 p17 protein: a pathogenetic mechanism for HIV-1-related anemia. *J Infect Dis* 2011; 204: 902-911
86. McGinniss MH, Macher AM, Rook AH, Alter HJ. Red cell autoantibodies in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Transfusion* 1986; 26: 405-409
87. Sasadeusz J, Buchanan M, Speed B. Reactive haemophago- cytic syndrome in human immunodeficiency virus infec- tion. *J Infect* 1990; 20: 65-68
88. S. Szilvassy, *The Biology of Hematopoietic Stem Cell*, *Archives of Medical Research* 34 (2003) 446-460
89. Abramson S, Miller RG, Phillips RA. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *J Exp Med* 1977; 145: 1567-1579.

90. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168–1170.
91. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med* 2000;6:1229–1234.
92. Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003;111:843–850.
93. Shizuru JA, Negrin RS, Weissman IL. Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system. *Annu Rev Med* 2005; 56: 509-538
94. Louache F, Debili N, Marandin A, Coulombel L, Vainchenker W. Expression of CD4 by human hematopoietic progenitors. *Blood* 1994; 84: 3344-3355
95. Zauli G, Furlini G, Vitale M, Re MC, Gibellini D, Zamai L, Visani G, Borgatti P, Capitani S, La Placa M. A subset of human CD34+ hematopoietic progenitors express low levels of CD4, the high-affinity receptor for human immunodeficiency virus-type 1. *Blood* 1994; 84: 1896-1905
96. Deichmann M, Kronenwett R, Haas R. Expression of the human immunodeficiency virus type-1 coreceptors CXCR-4 (fusin, LESTR) and CKR-5 in CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1997; 89: 3522-3528
97. Kitano K, Abboud CN, Ryan DH, Quan SG, Baldwin GC, Golde DW. Macrophage-active colony-stimulating factors enhance human immunodeficiency virus type 1 infection in bone marrow stem cells. *Blood* 1991; 77: 1699-1705

98. Steinberg HN, Crumpacker CS, Chatis PA. In vitro suppression of normal human bone marrow progenitor cells by human immunodeficiency virus. *J Virol* 1991; 65: 1765-1769
99. Molina JM, Scadden DT, Sakaguchi M, Fuller B, Woon A, Groopman JE. Lack of evidence for infection of or effect on growth of hematopoietic progenitor cells after in vivo or in vitro exposure to human immunodeficiency virus. *Blood* 1990; 76: 2476-2482
100. Chelucci C, Hassan HJ, Locardi C, Bulgarini D, Pelosi E, Mariani G, Testa U, Federico M, Valtieri M, Peschle C. In vitro human immunodeficiency virus-1 infection of purified hematopoietic progenitors in single-cell culture. *Blood* 1995; 85: 1181-1187
101. Weichold FF, Zella D, Barabitskaja O, Maciejewski JP, Dunn DE, Sloand EM, Young NS. Neither human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) nor HIV-2 infects most-primitive human hematopoietic stem cells as assessed in long-term bone marrow cultures. *Blood* 1998; 91: 907-915
102. Hariharan D, Li Y, Campbell DE, Douglas SD, Starr SE, Ho W. Human immunodeficiency virus infection of human placental cord blood CD34+AC133+ stem cells and their progeny. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 1545-1552
103. von Laer D, Hufert FT, Fenner TE, Schwander S, Dietrich M, Schmitz H, Kern P. CD34+ hematopoietic progenitor cells are not a major reservoir of the human immunodeficiency virus. *Blood* 1990; 76: 1281-1286
104. Davis BR, Schwartz DH, Marx JC, Johnson CE, Berry JM, Lyding J, Merigan TC, Zander A. Absent or rare human immunodeficiency virus infection of bone marrow stem/progenitor cells in vivo. *J Virol* 1991; 65: 1985-1990
105. Stanley SK, Kessler SW, Justement JS, Schnittman SM, Greenhouse JJ, Brown CC, Musongela L, Musey K, Kapita B, Fauci AS. CD34+ bone marrow cells are infected with HIV in a subset of seropositive individuals. *J Immunol* 1992; 149: 689-697

106. Majka M, Rozmyslowicz T, Lee B, Murphy SL, Pietrkowski Z, Gaulton GN, Silberstein L, Ratajczak MZ. Bone marrow CD34(+) cells and megakaryoblasts secrete beta-chemokines that block infection of hematopoietic cells by M-tropic R5 HIV. *J Clin Invest* 1999; 104: 1739-1749
107. Zhang J, Scadden DT, Crumpacker CS. Primitive hematopoietic cells resist HIV-1 infection via p21. *J Clin Invest* 2007; 117: 473-481
108. Redd AD, Avalos A, Essex M. Infection of hematopoietic progenitor cells by HIV-1 subtype C, and its association with anemia in southern Africa. *Blood* 2007; 110: 3143-3149
109. Maciejewski JP, Weichold FF, Young NS. HIV-1 suppression of hematopoiesis in vitro mediated by envelope glycoprotein and TNF-alpha. *J Immunol* 1994; 153: 4303-4310
110. Schwartz GN, Kessler SW, Szabo JM, Burrell LM, Francis ML. Negative regulators may mediate some of the inhibitory effects of HIV-1 infected stromal cell layers on erythropoiesis and myelopoiesis in human bone marrow long term cultures. *J Leukoc Biol* 1995; 57: 948-955
111. Marandin A, Canque B, Coulombel L, Gluckman JC, Vainchenker W, Louache F. In vitro infection of bone marrow-adherent cells by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) does not alter their ability to support hematopoiesis. *Virology* 1995; 213: 245-248
112. Kojouharoff G, Ottmann OG, von Briesen H, Geissler G, Rübsamen-Waigmann H, Hoelzer D, Ganser A. Infection of granulocyte/monocyte progenitor cells with HIV1. *Res Virol* 1991; 142: 151-157
113. Kanmogne GD, Primeaux C, Grammas P. Induction of apoptosis and endothelin-1 secretion in primary human lung endothelial cells by HIV-1 gp120 proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 1107-1115
114. Gibellini D, Vitone F, Buzzi M, Schiavone P, De Crignis E, Cicola R, Conte R, Ponti C, Re MC. HIV-1 negatively affects the

survival/maturation of cord blood CD34(+) hematopoietic progenitor cells differentiated towards megakaryocytic lineage by HIV-1 gp120/CD4 membrane interaction. *J Cell Physiol* 2007; 210: 315-324

115. Banda NK, Tomczak JA, Shpall EJ, Sipple J, Akkina RK, Steimer KS, Hami L, Curiel TJ, Singer Harrison G. HIV- gp120 induced cell death in hematopoietic progenitor CD34+ cells. *Apoptosis* 1997; 2: 61-68
116. Enciclopedia Treccani on-line: Hiv in Enciclopedia della Scienza e della Tecnica ([http://www.treccani.it/enciclopedia/hiv_\(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica\)/](http://www.treccani.it/enciclopedia/hiv_(Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica)/))
117. Human Immunodeficiency Virus (HIV). (<http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>)
118. Wang L, Mondal D, La Russa VF, Agrawal KC: Suppression of clonogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by HIV type 1: putative role of HIV type 1 tat protein and inflammatory cytokines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002, 18:917-931
119. Chelucci C, Federico M, Guerriero R, Mattia G, Casella I, Pelosi E, Testa U, Mariani G, Hassan HJ, Peschle C: Productive human immunodeficiency virus-1 infection of purified megakaryocytic progenitors/precursors and maturing megakaryocytes. *Blood* 1998, 91:1225-1234.
120. Gibellini D, Alviano F, Miserocchi A, Tazzari PL, Ricci F, Clò A, Morini S, Borderi M, Viale P, Pasquinelli G, et al.: HIV-1 and recombinant gp120 affect the survival and differentiation of human vessel wall-derived mesenchymal stem cells. *Retrovirology* 2011, 8:40.
121. Zauli, Vitale, Gibellini: Inhibition of purified CD34+ hematopoietic progenitor cells by human immunodeficiency virus 1 or gp120 mediated by endogenous transforming growth factor beta 1., Published January 1, 1996 // *JEM* vol. 183 no. 1 99-108
122. Kamenetz Y, Beloosesky Y, Zeltzer C, Gotlieb D, Magazanik A, Fishman P, Grinblat J., Relationship between routine hematological parameters, serum IL-3, IL-6 and erythropoietin and mild anemia and

degree of function in the elderly. *Aging (Milano)*. 1998 Feb;10(1):32-8