Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

Dipartimento di Scienze Biomolecolari

Dottorato di Ricerca in
Scienze della Vita, Salute e Biotecnologie
Curriculum Biotecnologie, Biochimica e Farmacologia
Ciclo XXIX

Studio della risposta immunitaria umorale anti-Tat in soggetti HIV-1 positivi

---

SSD BIO-10

Relatore: Chiar.mo Prof.
MAURO MAGNANI

Dottoranda: Dott.ssa
ALFONSINA MARIAROSARIA CANGIANO

ANNO ACCADEMICO 2015-2016

INDICE

Abstract Pag. 5

Introduzione 7

Capitolo 1

1.1 Caratteristiche biologiche e processo replicativo del virus HIV-1 10

1.1.1 Struttura del virione 10

1.1.2 Organizzazione del genoma 12

1.1.3 Ciclo replicativo 16

1.2 La proteina Tat: le caratteristiche amminoacidiche, il ruolo nell'infezione virale e il rapporto con la variabilità genetica di HIV-1 21

1.2.1 Caratteristiche della struttura primaria 21

1.2.2 Azione autocrina e paracrina della proteina Tat 23

1.2.3 Differenze amminoacidiche e funzionali tra le varianti della proteina Tat 28

1.3 Scopo della tesi 32

Capitolo 2

Materiali e metodi 34

2.1 Campioni biologici 34

2.2 Le proteine ricombinanti Tat clade B e C30S31 Tat clade C 35

2.3 Clonaggio della proteina C30C31 C-Tat: mutagenesi sito-specifica 35

2.4 Espressione e purificazione della proteina ricombinante C30C31 Tat clade C 38

2.5 Caratterizzazione della proteina ricombinante C30C31 C-Tat: Western Immunoblotting e test ELISA 41
2.6 Ottimizzazione del test ELISA 43
2.6.1 Preparazione del controllo negativo: purificazione delle IgG umane (HIgG) da campioni di plasma di soggetti sani 43
2.6.2 Preparazione del controllo positivo 44
2.6.3 Caratterizzazione del controllo positivo 45
2.6.4 Definizione del cut-off 46
2.7 Valutazione della risposta IgG anti B-Tat/C30S31 C-Tat/C30C31 C-Tat 48
2.8 Western Immunoblotting per la detection degli anticorpi anti-Tat 48
2.9 Epitope-mapping degli anticorpi Tat specifici 49
2.10 Estrazione del DNA 50
2.11 Quantificazione dell'HIV DNA cellulare 50
2.12 Determinazione dei sottotipi di HIV-1 dai pazienti provenienti dall'Africa 52
2.13 Analisi dei dati 53

Capitolo 3

Risultati 54

3.1 Produzione e caratterizzazione della proteina ricombinante C30C31 Tat clade C 54
3.2 Ottimizzazione del test ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-Tat verso le tre varianti della proteina virale 62
3.2.1 Valutazione delle performance del controllo positivo 62
3.2.2 Determinazione dei valori di cut-off 69
3.2.3 Definizione dei valori di accettabilità degli standard relativamente ai tre saggi ELISA 76
3.3 Valutazione della risposta IgG anti-Tat clade B e analisi dei livelli di infezione nella coorte di pazienti HIV-1 positivi Europei 78

3.4 Analisi della risposta anticorpale anti-Tat clade B per i 26 soggetti sieropositivi "detectable" 89

3.5 Analisi epitope-mapping degli anticorpi anti-Tat per i campioni IgG anti B-Tat detectable: titolo IgG anti B-Tat >200 vs titolo IgG anti B-Tat ≤200 95

3.6 Valutazione della presenza e cross-clade reattività delle IgG anti-Tat nella coorte di pazienti HIV-1 positivi provenienti da paesi Africani 98

3.7 Analisi della risposta IgG anti-Tat in relazione con i livelli di infezione virale 102

3.8 Analisi epitope-mapping degli anticorpi anti-Tat: sieropositivi con risposta IgG anti-Tat "cross-clade reattiva" vs sieropositivi con risposta IgG anti-Tat "no cross-clade reattiva" nella coorte Africana 108

3.9 Determinazione dei sottotipi di HIV-1 infettanti i soggetti sieropositivi Africani 110

Capitolo 4

Discussione 113

Bibliografia 120

ABSTRACT

The Tat regulatory protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) plays a key role in viral infectivity and HIV-1 infection progression to AIDS.

In natural infection, Tat represents an important target for the host immune response: it is able to stimulate both a cell-mediated immune response (Th1) capable of controlling virus replication in the acute phase of infection and a humoral immune response (Th2) with the presence of circulating antibodies that correlates with a slower infection progression. This is an important aspect in order to the development of a therapeutic vaccination strategy able to counteract Tat protein activities and, therefore, the HIV-1 virus spread.

The aim of this work was to analyze the anti-Tat antibody response in the natural HIV-1 infection with relation to the immunological status (CD4+ T cell count), levels of viral replication (HIV RNA copies/ml) and persistence of virus (cellular HIV DNA copies/10^4 CD4). Regarding the HIV-1 genetic variability, we studied the antibody response against the Tat protein of HIV-1 clade B, which is the predominant strain in Europe, and clade C, in particular against two Tat variants that differ for the cysteine content: Cys30Ser31 and Cys30Cys31 Tat clade C. Subtype C is largely predominant in Asia and Southern and Eastern Africa, where there is the largest outbreak of HIV-1 infection worldwide.

First of all, we took care to develop and optimize three ELISA assays to detect specific IgG against the three Tat antigens. In the optimization phase, we defined the reference values of standards (positive control, negative control and background) in order to ensure the functionality and reproducibility of tests, and the cut-off value, for each Tat antigens, required to discriminate HIV-1 infected individuals with circulating anti-Tat antibodies from non-presenting patients.

Subsequently, we analyzed anti B-Tat IgG response in a cohort of European HIV-1 positive subjects and evaluated the presence and cross-clade reactivity of immunoglobulins type G against three Tat antigens in a cohort of African patients.

Our data suggest a positive clinical status when the anti-Tat antibody response is present with respect to its absence. Nevertheless, the presence of anti-Tat antibodies does not seem to be a prerogative of a positive clinical condition: in a situation of high viral activity, an intensive stimulation of immune response may occur that may be responsible of an anti-Tat polyclonal antibody response that seems to be characterized by non-protective immunoglobulins.

Moreover, concerning the genetic heterogeneity of circulating HIV-1 subtypes, our results seem to suggest that variations in Tat protein may be responsible of differences in its processing as antigen with effects on the release of protective antibodies and with “cross-clade reactivity” properties. In particular, immunoglobulins able to recognize clade B Tat protein seem to be involved in protective effects of the anti-Tat antibody response as opposed to antibodies reactive against clade C Tat variants.

Furthermore, it would seem to be present a “clade-specificity” concerning the stimulation of a cross-clade reactive and protective anti-Tat antibody response linked to infection caused by CRF 02_AG and, especially, by subtype B.

Further studies are needed to better understand the features of the regulatory protein and of the anti-Tat immune response, not neglecting differences between several circulating viral subtypes and recombinant forms, considering the Tat protein use as vaccine antigen for HIV/AIDS vaccine development.

INTRODUZIONE

La ***Sindrome da immunodeficienza acquisita*** (***AIDS***: Acquired Immune Deficiency Syndrome) è oggetto di un'intensa attività di ricerca sin dal 1981, quando è stata descritta per la prima volta dal Centers for Disease Control and Prevention (CDC) negli Stati Uniti d'America, in seguito all'individuazione di alcuni casi sospetti di polmonite da Pneumocystis carinii [1].

Nelle fasi iniziali degli studi sull'individuazione dell'agente eziologico dell'AIDS, diversi virus (CMV, EBV, HBV, Adenovirus) furono individuati come possibili responsabili della sindrome per l'elevata frequenza con cui venivano isolati dai soggetti affetti da AIDS.

Nel 1983, il gruppo di ricerca di Françoise Barré-Sinoussi, dell'Istituto Pasteur di Parigi, riportò l'individuazione di un retrovirus che si riteneva potesse essere causa della sindrome da immunodeficienza acquisita; il virus venne denominato ***LAV*** (Lymphadenopathy Associate Virus) [2].

Contemporaneamente, Robert Gallo e i suoi collaboratori, del National Cancer Institute, isolarono un virus dai pazienti affetti da AIDS individuato come ***HTLV-III*** (Human T-lymphotropic Virus-III) [3]. Successivamente si riconobbe che il LAV e l'HTLV-III erano lo stesso virus, un retrovirus che soddisfaceva tutti i criteri necessari per poter essere considerato l'agente eziologico dell'AIDS, ufficialmente identificato come ***Human Immunodeficiency Virus*** (HIV) [4, 5].

Con il nome generico di HIV vengono indicati 2 diversi tipi di virus: ***HIV-1*** e ***HIV-2***.

Il virus HIV-1 è maggiormente diffuso, responsabile delle infezioni in Europa, nelle Americhe e nell'Africa Sub-Sahariana. HIV-2 è presente in alcune regioni dell'Africa Occidentale [6]; è un virus meno aggressivo, responsabile di un decorso più lento e attenuato dell'infezione verso la malattia conclamata [7, 8].

Il virus HIV-1 è responsabile di una lenta e irremissibile malattia caratterizzata da una progressiva compromissione della funzionalità del sistema immunitario.

Sono state individuate tre principali fasi dell'infezione da HIV. Nella prima fase, nota come infezione ***primaria*** o ***acuta***, i soggetti manifestano segni e sintomi analoghi alla sindrome influenzale o mononucleosica, si parla di "*Sindrome retrovirale acuta*" [9]. L'infezione acuta è caratterizzata da un'intensa attività replicativa del virus, questo permette la sua disseminazione a livello degli organi linfoidi ricchi di linfociti T CD4+, che rappresentano il principale bersaglio cellulare di HIV-1.

Si assiste, quindi, ad una riduzione significativa dei livelli di linfociti T CD4+, in associazione ad un elevato numero di particelle virali in circolo (valutato in termini di copie di HIV RNA per ml di plasma) [10, 11].

Gli alti livelli di viremia normalmente hanno breve durata grazie all'azione del sistema immunitario dell'ospite: la risposta immunitaria cellulo-mediata virus-specifica, presieduta dai linfociti T CD8+ con attività citotossica, ha un ruolo centrale nel controllo iniziale della replicazione virale [12-17], coadiuvata dalla risposta anticorpale [18-20]. Si assiste, così, alla riduzione della carica virale e ad un "*rebound*" dei livelli di linfociti T CD4+.

La maggior parte dei soggetti infetti entra nella fase ***cronica*** o ***clinicamente latente*** dell'infezione, associata a bassi livelli di carica virale nel sangue e all'assenza di sintomi [21]. Durante questa fase, il sangue periferico non riflette precisamente l'effettivo stato di propagazione del virus nell'intero organismo: sono, infatti, gli organi linfoidi la sede principale della replicazione e propagazione di HIV-1, con conseguente progressiva diminuzione del numero dei linfociti T CD4+ [22], nonché comparsa di difetti funzionali anche a carico dei monociti e dei macrofagi.

Il progredire dell'immunodepressione può portare al raggiungimento di valori al di sotto delle 200 cellule CD4+ per µl e, contemporaneamente, all'aumento della viremia. Tali condizioni conducono alla fase clinicamente sintomatica della malattia, nota come fase dell'***AIDS conclamata***: l'organismo è fortemente vulnerabile alle infezioni opportunistiche [23, 24], altrettanto alto è il rischio di affezioni neoplastiche [25] e lesioni degenerative a carico del Sistema Nervoso Centrale (SNC) [18].

Attualmente, dopo oltre 30 anni di ricerche sul virus HIV-1, si è riusciti a trasformare un'infezione letale a malattia cronica grazie alla terapia farmacologica.

Comunque, la pandemia di HIV/AIDS rimane ancora la prima emergenza sanitaria nel mondo. Nel 2014 sono stati registrati 36,9 milioni di persone infette, nonché circa 2 milioni di nuove infezioni e 1,2 milioni di morti per patologie legate all'AIDS [26, 27].

Numeri questi che spingono fortemente al continuo approfondimento della biologia del virus HIV per identificare pathway e molecole che hanno un ruolo chiave nella patogenesi dell'infezione, tale da indirizzare verso nuovi campi di ricerca per la messa a punto di farmaci e vaccini.

CAPITOLO 1

1.1 Caratteristiche biologiche e processo replicativo del virus HIV-1

1.1.1 Struttura del virione

HIV-1 è un membro del genere ***Lentivirus***, appartenente alla famiglia ***Retroviridae***.

La particella virale di HIV ha un diametro di 100-120 nm. Analizzando la struttura del virione, dall'esterno verso l'interno si possono identificare (fig.1):

- un involucro lipoproteico, detto ***envelope***;
- una ***matrice*** di natura proteica;
- il ***capside*** che racchiude il materiale genetico.

Sul versante esterno dell'envelope sono presenti dei complessi di glicoproteine virali, costituiti da un trimero di ***gp120*** ancorato alla struttura trimerica transmembranale di ***gp41***. Durante il processo di gemmazione della nuova particella virale dalla cellula infettata, il virus può incorporare a livello dello strato lipoproteico differenti componenti cellulari di membrana, come le molecole dell'***MHC*** (Major Histocompatibility Complex) di I e di II classe, a seconda del tipo di cellula infettata, o proteine di adesione, come ICAM-1, che possono agevolare l'adesione del virus ad altre cellule bersaglio [10, 11, 28].

La matrice proteica è costituita dalla proteina ***p17***, la quale è direttamente ancorata alla faccia interna dell'envelope. La membrana lipoproteica e la matrice vanno, così, a delimitare l'ambiente occupato dal capside virale.

Il capside presenta una caratteristica forma cilindro-conica, costituito dalla proteina ***p24***. Tale struttura racchiude due molecole identiche di RNA a singolo filamento con polarità positiva, combinate con le nucleoproteine ***p7*** e ***p9*** (dette anche proteine del nucleocapside, NC) [29], e gli enzimi ***Proteasi*** (PR), ***Trascrittasi Inversa*** (Reverse Transcriptase, RT) e ***Integrasi*** (IN) [30].

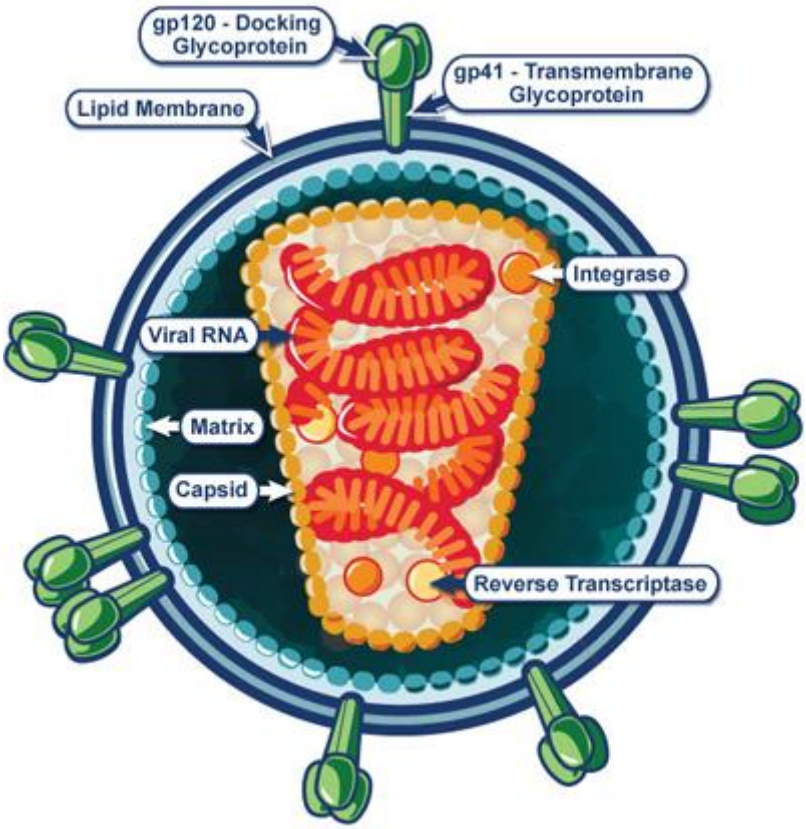


Figura 1. Struttura del virione di HIV [31].

1.1.2 Organizzazione del genoma

Il genoma virale misura circa 9.2 kb ed è costituito da due molecole identiche di RNA a singolo filamento con polarità positiva, come riportato precedentemente.

Entrambe le molecole hanno un ***cap*** all'estremità 5' e sono ***poliadenilate*** all'estremità 3' [30, 32]. Ciascuna molecola di RNA genomico presenta agli estremi sequenze non codificanti, delle quali la più esterna è ripetuta ed identica alle due estremità (sequenza **R**), mentre quelle più interne sono caratteristiche dell'estremo 5' (sequenza **U5**) e dell'estremo 3' (sequenza **U3**).

L'RNA virale non viene direttamente tradotto nella cellula ospite, pur avendo caratteristiche simili agli RNA messaggeri (mRNA) cellulari, ma viene retrotrascritto dall'enzima trascrittasi inversa (RT), presente nel virione, in DNA a doppio filamento. Tale molecola viene integrata nel genoma della cellula ospite (si parla di ***DNA provirale*** o ***provirus***), grazie all'attività dell'integrasi (IN) virale, e subisce il processo di trascrizione ad opera della RNA polimerasi II cellulare.

Nel processo di trascrizione, le sequenze U5 e U3 vengono retrotrascritte ad entrambe le estremità della molecola di DNA virale che risulta essere più lunga dell'RNA genomico. Il complesso U3-R-U5, presente ad entrambi gli estremi, forma la regione ***LTR*** (Long Terminal Repeat). Le regioni LTR hanno un ruolo importante nell'integrazione e nella trascrizione del DNA provirale.

In modo particolare, ai fini della trascrizione, al livello della sequenza U3 di LTR 5' si trova il promotore cellulare "*TATA box*" e la regione enhancer "*CAT box*", una sequenza associata all'attività della RNA polimerasi II cellulare [30], nonché sono presenti i siti di legame per fattori trascrizionali cellulari, come NF-kB e Sp1 [33].

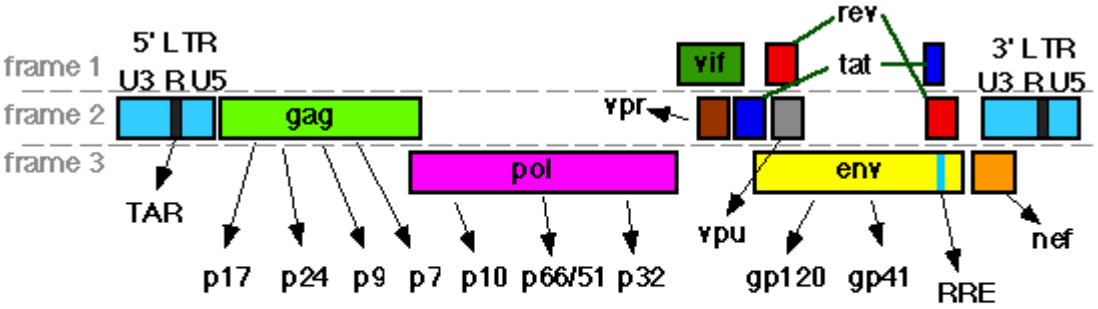
A livello delle sequenze R e U5 di LTR 3' è presente il segnale di poliadenilazione che determina la fine della trascrizione dell'mRNA.

All'estremità 5' del genoma virale sono presenti diverse sequenze segnale, importanti per il processo di retrotrascrizione e di trascrizione del genoma, per gli eventi di splicing e di impacchettamento delle molecole di RNA virale "*full-length*":

- ✓ la regione ***TAR*** (Trans-Activation Response element);
- ✓ il segnale di poliadenilazione ***5' poly A-hairpin***;
- ✓ il sito di legame del primer ***PBS*** (Primer Binding Site);
- ✓ il segnale di ***packaging*** (ψ);
- ✓ il sito di dimerizzazione ***DIS*** (Dimerization Initiation Sequence);
- ✓ il maggiore sito donatore di splicing ***MSD*** (Major Splice Donor) [34-37].

Una caratteristica del genoma del virus HIV-1 è la presenza di sequenze geniche con più ***Open Reading Frame*** (ORF) [18], ciò permette di codificare per un'ampia gamma di proteine virali a partire da un elemento genico limitato.

HIV-1 possiede 3 geni necessari a garantire la replicazione virale: ***gag***, ***pol*** ed ***env*** (fig.2) [29, 30]. Il gene **gag** codifica per le proteine strutturali della matrice (p17), del capside (p24) e le proteine del nucleocapside (p7 e p9); il gene **pol** per le proteine enzimatiche (trascrittasi inversa, integrasi e proteasi) ed **env** per le glicoproteine dell'envelope (gp120 e gp41).



gag:
p17 - myristylated capsid protein
p24 - major capsid protein
p9 - RNA-binding nucleocapsid protein
p7 - RNA-binding nucleocapsid protein

pol:
p10 - protease
p66/51 - reverse transcriptase (heterodimer)
p32 - integrase

env:
gp120 - envelope glycoprotein (external)
gp41 - envelope glycoprotein (transmebrane)

regulatory proteins:
tat: transactivating protein (transcription)
rev: regulator of viral protein synthesis
nef: "negative factor"

accessory proteins:
vif - virion infectivity factor
vpr - viral protein R (transactivator?)
vpu - viral protein U (virion release)

RNA sequence regions:
LTR - long terminal repeat
U3 - unique 3' region
R - terminal redundancy
U5 - unique 5' region
TAR - tat responsiveness
RRE - rev response element

Figura 2. Organizzazione del genoma di HIV.

Altrettanto importanti sono i geni accessori e regolatori: ***nef***, ***vpr***, ***vif***, ***vpu***, ***rev*** e ***tat*** (fig.2).

Il gene **nef** codifica per la proteina accessoria ***Nef***, una proteina in grado di promuovere la replicazione virale e la produzione di virus infettivi, nonché coinvolta nella capacità delle cellule infettate di evadere l'azione del sistema immunitario [11, 38-40].

La proteina ***Vpr***, codificata dal gene **vpr**, interviene soprattutto nel permettere la replicazione virale in cellule quiescenti, facilitando la traslocazione del genoma di HIV-1 dal citoplasma al nucleo della cellula ospite [41-44].

Il gene **vif** codifica per una piccola proteina, ***Vif***, importante per la maturazione di virioni altamente infettanti [11]. ***Vpu***, codificata dal gene vpu, interviene nell'assemblaggio, nella maturazione del virione e nel corretto rilascio della progenie virale [10, 11].

Il gene **rev** codifica per la proteina ***Rev***, la quale, interagendo con la sequenza ***RRE*** (Rev Response Element) localizzata nella regione env (fig.2), controlla la trascrizione degli RNA più lunghi e assicura il trasporto nucleo-citoplasma degli mRNA virali parzialmente o non sottoposti a splicing, che servono alla sintesi delle proteine virali strutturali, e delle molecole di RNA genomico, che costituiranno il materiale genetico della nuova progenie virale [18, 30, 37].

Per finire, il gene **tat** codifica per la proteina regolatoria ***Tat***, necessaria per l'espressione dei geni virali, per la trasmissione del virus cellula-cellula e, quindi, per la progressione dell'infezione verso la malattia conclamata [23].

1.1.3 Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo del virus HIV può essere sintetizzato nelle seguenti fasi:

1. fusione della membrana virale con quella cellulare e successiva entrata del capside nella cellula ospite;
2. destrutturazione del capside con rilascio del genoma e delle proteine enzimatiche virali;
3. retrotrascrizione dell'RNA virale;
4. integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite;
5. sintesi delle proteine virali e assemblaggio dei nuovi virioni;
6. maturazione e rilascio della progenie virale (fig.3) [11, 32].

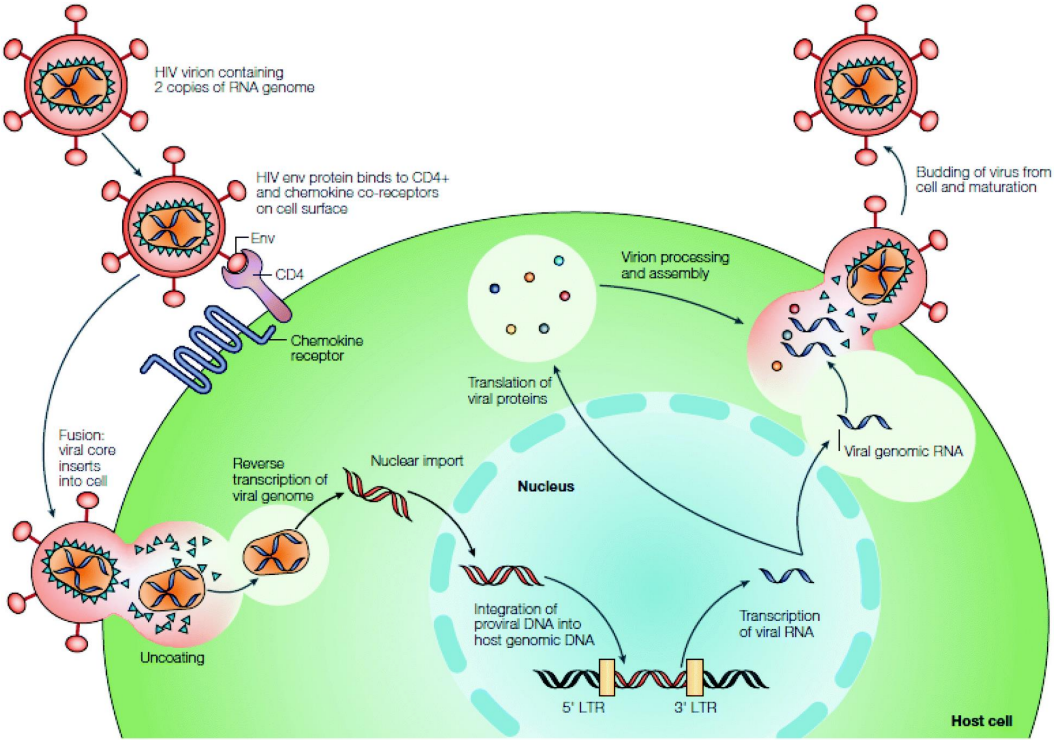


Figura 3. Ciclo replicativo del virus HIV.

Per poter entrare nella cellula ospite, HIV interagisce con diverse strutture superficiali della cellula. Importante è il legame della glicoproteina gp120 dell'envelope con il recettore cellulare ***CD4*** che è presente sulla membrana plasmatica dei ***linfociti T CD4+***, dei ***monociti/macrofagi***, delle ***cellule dendritiche*** e delle ***cellule della microglia*** del Sistema Nervoso Centrale, che rappresentano, quindi, le cellule bersaglio del virus [11]. Tuttavia, tale legame non è sufficiente a consentire l'entrata del virus nella cellula.

In seguito all'interazione gp120-recettore CD4, si verifica un cambiamento conformazionale della glicoproteina gp120 con esposizione di un sito specifico di legame ad un co-recettore presente sulla membrana della cellula ospite (fig.4) [10, 11, 45, 46].

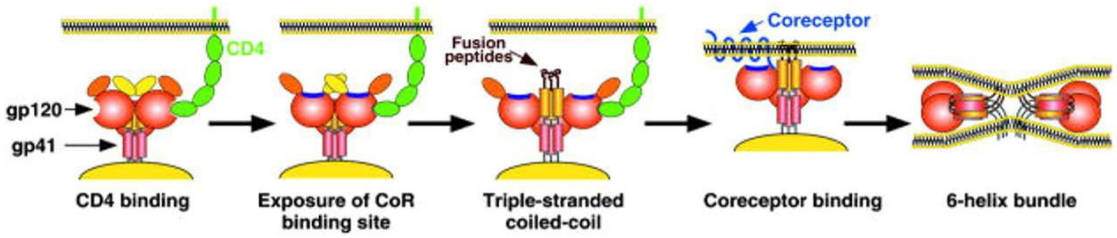


Figura 4. Fasi del processo di fusione tra la membrana virale e cellulare.

Il co-recettore è indispensabile per la fase di infezione.

Generalmente, i co-recettori coinvolti in tale processo sono i recettori delle chemochine, in particolare, ***CXCR4*** e ***CCR5***.

CXCR4 è il recettore dell'α-chemochina ***SDF-1*** (Stromal cell-derived factor 1), è espresso su molte cellule, in particolare sui linfociti T CD4+; CCR5 è il recettore delle β-chemochine come ***Rantes*** (Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted), ***MIP-1α*** e ***MIP-1β*** (Macrophage Inflammatory Protein), il quale è presente sui monociti/macrofagi, cellule dendritiche e linfociti T CD4+ [11, 46].

In base al co-recettore preferenzialmente legato, vengono distinti i ceppi di HIV-1 ***M-tropici*** o ***R5-tropici***, che legano CCR5, e i ceppi di HIV-1 ***T-tropici*** o ***X4-tropici***, che legano CXCR4 [10, 11, 46].

La doppia interazione di gp120 permette un ancoraggio più stabile del virus alla superficie della cellula ospite, così da consentire al peptide di fusione, presente all'estremità N-terminale di gp41, di penetrare la membrana cellulare e permettere la fusione delle membrane virale e cellulare (fig.4) [47], consentendo l'entrata del capside di HIV-1.

All'interno della cellula, il capside viene disassemblato (uncoating) e l'RNA genomico virale liberato, pronto per essere retrotrascritto dalla trascrittasi inversa (RT).

La trascrittasi inversa inizia la retrotrascrizione in direzione 5'⟶ 3' a partire dall'estremità 3' dell'innesco, una molecola di $tRNA^{Lys3}$ cellulare [37] appaiata a livello del sito PBS.

Si forma una molecola ibrida RNA/DNA. Il sito attivo con attività ribonucleasica, RNAsi H, della RT degrada il filamento stampo di RNA della molecola ibrida, invece il sito di polimerizzazione, della RT stessa, completa la sintesi del filamento complementare di DNA. Viene sintetizzata una molecola di DNA a doppio filamento che insieme alla proteina della matrice p17, a Vpr, all'enzima integrasi (IN) e ad ulteriori proteine virali e cellulari costituiscono il ***complesso di pre-integrazione*** (Pre-integration complex) [48, 49]. Tale complesso viene trasferito nel nucleo dove il DNA virale viene integrato nel genoma cellulare grazie all'azione dell'integrasi virale.

In seguito all'integrazione del genoma di HIV-1, ha inizio un'infezione attiva con espressione del provirus in cellule ospiti in uno stato replicativo attivo. Allo stesso tempo, il processo di integrazione può essere seguito dallo sviluppo di un'infezione non produttiva, latente.

Monociti/macrofagi, cellule dendritiche, cellule della microglia e, in modo particolare, i linfociti T CD4+ di memoria quiescenti (resting memory CD4+ T cells) possono andare incontro ad un'infezione virale latente. Essi rappresentano i "*reservoirs*" cellulari di HIV-1, responsabili della persistenza del virus nell'organismo ospite [50-54].

Si parla di diversi meccanismi molecolari responsabili della latenza del virus, come la possibile integrazione del DNA virale in regioni di eterocromatina non accessibili all'apparato trascrizionale della cellula, oppure il grado di metilazione del DNA virale o, ancora, l'assenza di fattori cellulari necessari per le fasi di inizio e allungamento della trascrizione del genoma virale [51-53].

Nell'infezione produttiva, lo stesso accade in seguito all'attivazione di cellule quiescenti infettate per mezzo dell'esposizione agli antigeni virali o ad altri stimoli [52, 55], si determina la sintesi precoce delle proteine regolatorie di HIV: Tat e Rev.

In modo particolare, la proteina Tat transattiva l'espressione dei geni virali: è in grado di aumentare l'efficienza della trascrizione virale, intervenendo nella regolazione, in modo particolare, durante la fase di elongazione del processo trascrizionale così da permettere la sintesi di mRNA lunghi e completi [33, 56, 57].

Gli mRNA più lunghi migrano nel citoplasma, grazie all'intervento della proteina Rev, dove vengono tradotti e, quindi, sintetizzate le proteine virali.

Dall'espressione del gene env viene sintetizzata una glicoproteina precursore, gp160 (Env), che viene poi digerita dalla proteasi virale in gp120 e gp41; ugualmente i precursori Gag e Pol, prodotti di espressione dei geni gag e pol rispettivamente, vengono digeriti dall'enzima proteasi così da ottenere, dalla digestione di Gag, i prodotti funzionali che andranno a formare la matrice (p17), il capside (p24) e le proteine del nucleocapside (p7 e p9) e, dalla digestione di Pol, gli enzimi trascrittasi inversa, integrasi e proteasi [11].

L'assemblaggio dei virioni avviene a ridosso della membrana plasmatica, nel cui processo la proteina precursore Gag è fondamentale perché coinvolta nelle fasi essenziali dell'assemblaggio delle particelle virali: interazione con la membrana plasmatica, formazione della struttura del capside, reclutamento a livello membranale della proteina precursore Env e impacchettamento dell'RNA genomico mediante interazione diretta con la sequenza di packaging (ψ) [28].

Vengono assemblate particelle virali immature che subiscono un processo di maturazione, quindi di acquisizione della capacità infettante, grazie all'azione dell'enzima proteasi a carico delle proteine virali precursori [11, 28, 32, 58].

I virioni assemblati vengono rilasciati dalla cellula ospite attraverso gemmazione dalla membrana plasmatica, con acquisizione dell'envelope lipoproteico esterno (fig.3).

1.2 La proteina Tat: le caratteristiche amminoacidiche, il ruolo nell'infezione virale e il rapporto con la variabilità genetica di HIV-1

1.2.1 Caratteristiche della struttura primaria

La proteina Tat di HIV-1 è un potente attivatore trascrizionale dei geni virali, essenziale per la replicazione del virus e, oltretutto, in grado di regolare l'espressione di molteplici geni cellulari, con ripercussioni sul controllo di diverse funzioni della cellula ospite.

Tat è una piccola proteina che ha una lunghezza variabile di 86-101 aminoacidi (aa), codificata da 2 esoni. Il prodotto del primo esone (aa 1-72) è sufficiente per la transattivazione dei geni di HIV-1, a livello del quale sono presenti: il dominio N-terminale acido (aa 1-21), il dominio ricco di Cisteina (CRD, Cysteine-rich domain; aa 22-37), il core (aa 38-48) e il dominio basico (aa 49-57) (fig.5) [59].

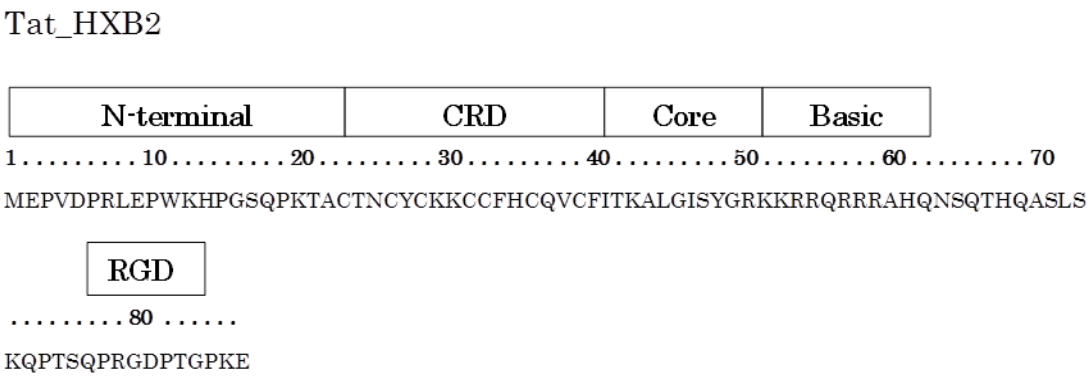


Figura 5. Sequenza amminoacidica della proteina Tat.

Il dominio N-terminale rappresenta un epitopo immunodominante della proteina virale [60, 61]; è stato valutato come la presenza di aminoacidi acidi, Glutammato (Glu, E) in posizione 2 e Aspartato (Asp, D) in posizione 5, è necessaria per il raggiungimento di una conformazione ad α-elica, con caratteristiche anfipatiche, simile alla struttura del dominio effettore di alcuni fattori trascrizionali, come GAL-4, importante per il funzionamento di Tat [62].

La regione ricca di Cisteina è coinvolta nella formazione di dimeri della proteina virale legati da ioni metallici bivalenti [63, 64]. La formazione di tali complessi è fortemente legata allo stato di ossidazione della proteina: l'interazione "*Tat-ione metallico*" è possibile quando la proteina è ridotta, tale da presentare gruppi tiolici liberi. Tale tipo di interazione, nel dettaglio "*Tat-Zin*$^{2+}$", oltretutto sembra intervenire nel "*binding*" della proteina con la ciclina cellulare T1 (CT1), componente insieme alla chinasi CDK9 (Cyclin-dependent kinase 9) del complesso pTEFb [65, 66]. In condizioni ossidanti, invece, si vengono a formare ponti disolfuro intra ed intermolecolari, questi responsabili della formazione di aggregati multimerici con compromissione dell'attività biologica della proteina [67].

Il dominio basico, ricco di residui di Lisina (Lys, K) e Arginina (Arg, R), funziona da segnale di localizzazione nucleare [68], così da permettere l'entrata di Tat nel nucleo della cellula ospite e conferisce alla proteina virale la capacità di interagire con la struttura a forcina (stem-loop) acquisita dalla sequenza TAR, elemento della regione LTR al 5' (fig.2) e localizzato a valle del sito di inizio della trascrizione (dal nucleotide +19 al +42), quando trascritta in RNA [33, 59, 69-71].

La regione C-terminale della proteina Tat, codificata dal secondo esone, non è necessaria per l'attività di transattivazione. Questa presenta il motivo ***RGD*** (Arginina-Glicina-Aspartato; aa 78-80), tipico delle proteine della matrice extracellulare, che interviene, insieme al dominio basico, nel mediare diversi effetti della Tat extracellulare [59, 69].

1.2.2 Azione autocrina e paracrina della proteina Tat

Nell'infezione virale attiva la proteina Tat viene precocemente sintetizzata e trasferita dal citoplasma al nucleo della cellula ospite, dove svolge il suo ruolo di transattivatore della trascrizione del genoma virale (***azione autocrina***), per il quale è importante l'interazione con il sito TAR degli RNA nascenti e con il complesso pTEFb. La chinasi CDK9 attiva, come già detto componente del complesso pTEFb, interviene nella fosforilazione dei residui di Serina a livello della regione C-terminale (CTD, C-terminal domain) della RNA polimerasi II cellulare, la quale risulta così in grado di portare a termine la sintesi dei trascritti virali (fig.6) [72].

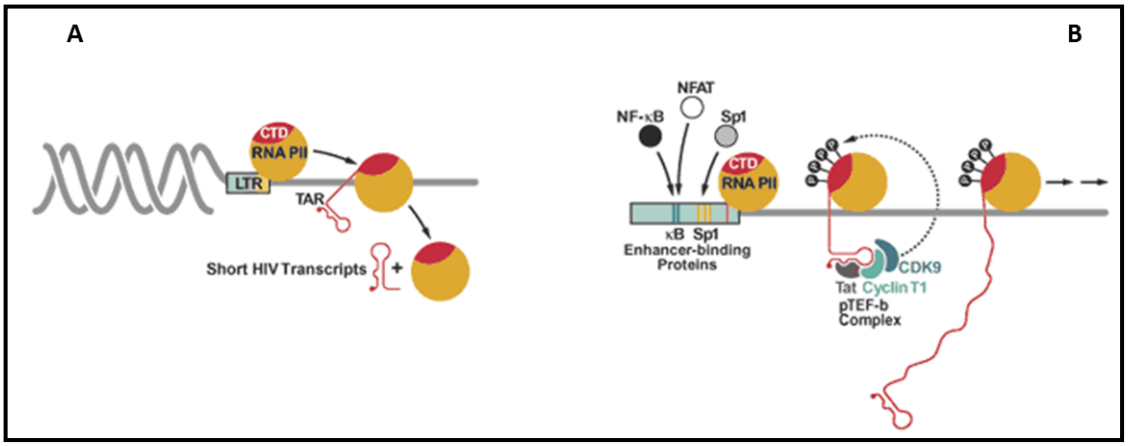


Figura 6. Trascrizione del DNA provirale in assenza (A) e in presenza (B) della proteina Tat.

Nella fase acuta dell'infezione la proteina virale viene rilasciata nell'ambiente extracellulare dalle cellule infettate. La Tat extracellulare è in grado di agire su diversi tipi cellulari ed è coinvolta in molteplici attività: si parla di ***azione paracrina*** della proteina Tat.

Innanzitutto, Tat è in grado di entrare in cellule quiescenti infettate dal virus e di traslocare nel nucleo, dove stimola la trascrizione del genoma virale [57, 73].

Per di più, interviene nel reclutamento e nell'attivazione di cellule non infettate, aumentando l'infettività del virus. È stata evidenziata la sua capacità di interagire con la regione V1/V2 di gp120, dando origine ad un complesso funzionale capace di migliorare l'attacco e l'entrata del virus nelle cellule target [74].

In tal modo favorisce la diffusione del virus, quindi la progressione dell'infezione.

La proteina Tat extracellulare agisce su cellule non infettate grazie alla sua capacità di interazione, tramite la regione basica e la sequenza RGD, con recettori cellulari di membrana, come: ***proteoglicani eparan-solfato*** (HSPGs, heparan sulphate proteoglycans), l'***LRP*** (lipoprotein receptor-related protein), recettori ***VEGF*** (vascular endothelial growth factor), i recettori delle chemochine ***CXCR4*** e ***CD26*** (dipeptidyl aminopeptidase IV), $\boldsymbol{\alpha_5\beta_1}$, $\boldsymbol{\alpha_5\beta_3}$ e $\boldsymbol{\alpha_5\beta_5}$ della famiglia delle integrine. L'interazione "*Tat-recettore*" è in grado di permettere l'internalizzazione cellulare della proteina regolatoria, basti pensare ai recettori CD26, LRP e HSPGs che consentono l'"*uptake*" di Tat mediante endocitosi [68, 73, 75, 76].

Tutto ciò consente alla proteina Tat di intervenire nella modulazione dell'espressione di molteplici geni cellulari.

In particolare, Tat è responsabile dell'aumento dell'espressione di citochine infiammatorie come TNFα e TNFβ, IL-1α e IL-1β, IL-6 e INFγ da parte di linfociti, monociti e macrofagi [59, 70]. Alti livelli di tali citochine infiammatorie sono capaci di potenziare l'espressione dei geni virali e quindi la diffusione del virus [77].

Stimola la sintesi delle molecole di adesione "*leucociti-cellule endoteliali*", come ELAM ed E-Selectina. La molecola ELAM è un marker di attivazione delle cellule endoteliali che media l'interazione dei monociti, delle cellule Natural Killer (NK) e dei linfociti T

CD4+ con l'endotelio. L'incremento di produzione di tale molecola, insieme all'"*upregulation*" dell'espressione dell'IL-6 e del TNF, può portare ad una intensificazione dell'interazione "*linfociti T CD4+ infettati-cellule endoteliali*" e del processo di "*extravasation*" delle cellule infettate nei tessuti sottostanti, con implicazioni importanti nella patogenesi di diverse patologie correlate all'AIDS [59].

La proteina virale è in grado, oltretutto, di attraversare efficientemente la barriera ematoencefalica. Questo le permette di poter agire direttamente sui neuroni promuovendo il processo di morte per apoptosi, nonché di stimolare l'espressione delle ***matrix metalloproteinases*** (MMPs), proteine normalmente coinvolte nella degradazione delle proteine della matrice extracellulare e dei componenti della barriera ematoencefalica [72, 78]. Si tratta di eventi fortemente coinvolti nella patogenesi delle lesioni a carico del Sistema Nervoso Centrale, responsabili della manifestazione di encefalopatia associata all'AIDS (***ADC***: AIDS-dementia complex).

Tat stimola l'espressione dei protooncogeni ***c-fos*** e ***c-fms***, così come della proteina anti-apoptotica ***Bcl-2***, comportando un alto rischio di disordini neoplastici [59, 72].

È stato osservato, inoltre, che la proteina Tat esercita una potente azione angiogenetica: è in grado, in sinergia con le citochine infiammatorie IL-1β, TNFα e IFNγ, di promuovere la crescita, la migrazione, l'invasione e l'adesione delle cellule endoteliali. Quindi, stimola il manifestarsi di eventi angioproliferativi, alla base della patogenesi del Sarcoma di Kaposi (KS), nei soggetti infetti da HIV-1 [59, 79-82].

La Tat extracellulare contribuisce attivamente e in diverso modo all'immunosoppressione associata all'infezione da HIV-1.

È stata evidenziata la sua capacità di inibire la sintesi di ossido nitrico (NO) a livello dei macrofagi, tale da venir meno un'importante e primaria linea difensiva dell'organismo, con conseguente aumento della vulnerabilità del soggetto infetto verso infezioni opportunistiche [72]. Anche l'over-espressione indotta di INF-α sembra essere correlata ad effetti immunosoppressivi sulle cellule T non infettate [72]. Altrettanto importante è il coinvolgimento di Tat nella "*down-regulation*" dell'espressione delle molecole dell'MHC di I classe, compromettendo l'attivazione dei linfociti T CD8+

citotossici che sono importanti nel controllo della propagazione del virus nelle prime fasi di infezione [59,72]. È responsabile della compromissione dell'attività citotossica delle cellule Natural Killer: la proteina Tat regola negativamente l'espressione del fattore LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1) pregiudicando il processo di attivazione della chinasi CAMK-II (calcium-calmodulin kinase-II) e quindi l'entrata di calcio nelle NK, importante per la secrezione di perforine, serin-proteasi (granzymes) e INF-γ [83].

La proteina Tat extracellulare interviene nell'iper-attivazione dei linfociti T CD4+ che è responsabile del progressivo esaurimento del pool di cellule T, quindi dei principali organizzatori della risposta immunitaria, nel soggetto sieropositivo [84].

Tat controlla l'attivazione del fattore trascrizionale NF-kB con aumento dell'espressione di diverse citochine, tra cui l'IL-2 che promuove l'attivazione delle cellule T CD4+ naïve così da divenire suscettibili all'infezione da parte di HIV-1 [85]. L'infezione diretta dei linfociti T CD4+ può avere come conseguenza la lisi cellulare, quindi deplezione di tali cellule: si parla di ***effetto citopatico*** (CPE) ***diretto*** del virus [18, 86, 87].

Linfociti T CD4+ attivi che, indipendentemente dall'infezione virale, possono andare in contro ad alterazioni del ciclo cellulare responsabili di morte per apoptosi delle cellule linfocitarie. Si parla di ***Cell-Cycle Dysregulation*** (CCD), identificato come "*meccanismo indiretto di immunodeficienza*" [88].

Nell'infezione naturale da HIV-1, la proteina Tat rappresenta un "*target*" importante della risposta immunitaria dell'organismo ospite, che è tesa ad attivare meccanismi al fine di contrastare la progressione dell'infezione. In particolare, Tat viene selettivamente ed efficientemente internalizzata e processata dalle cellule dendritiche derivate dai monociti (MDDC, monocyte-derived dendritic cells), così da promuovere la loro maturazione e l'attività di cellule presentanti l'antigene (APC), le quali sono fortemente capaci di stimolare una risposta immunitaria cellulo-mediata, di tipo Th1 [89, 90]. Una risposta cellulo-mediata che vede in prima fila l'intervento dei linfociti T CD8+ citotossici anti-Tat in grado di eliminare le cellule infettate dal virus.

Tat, allo stesso tempo, stimola una risposta umorale, di tipo Th2, con la presenza in circolo di anticorpi Tat specifici che, anche se moderata rispetto alle risposte anticorpali specifiche verso altri prodotti virali, sembra essere in grado di giocare un ruolo protettivo intervenendo nel controllo della progressione dell'infezione virale [23, 91-95].

Aspetto, questo, importante e a sostegno di un utilizzo della proteina Tat come principio attivo di un potenziale vaccino preventivo e terapeutico contro il virus HIV-1: un vaccino basato su Tat, infatti, implica agire contro una proteina che ha un ruolo chiave nella replicazione virale e nella patogenesi dell'AIDS [96, 97].

1.2.3 Differenze amminoacidiche e funzionali tra le varianti della proteina Tat

Una caratteristica peculiare del virus HIV-1 è l'ampia e dinamica eterogeneità genetica, alla base dell'identificazione di diversi sottotipi virali. L'elevato tasso replicativo, l'assenza dell'attività di "*proofreading*" da parte della trascrittasi inversa, nonché eventi di ricombinazione genetica tra i sottotipi del virus sono causa della variabilità genetica di HIV-1 [98, 99].

Filogeneticamente, sono stati definiti 4 gruppi in cui sono classificate le varianti del virus: M (main), O (outlier), N (non-M, non-O) e P. Il gruppo M è responsabile della quasi totalità delle infezioni registrate a livello mondiale, all'interno del quale vengono identificati 9 sottotipi (o clade) geneticamente differenti (A-D, F-H, J e K) [100, 101] e ben 79 forme ricombinanti (***CRFs***: circulating recombinant forms), secondo l'ultimo aggiornamento, del 2016, del database Los Alamos [102].

I sottotipi virali sono differentemente distribuiti nelle diverse parti del mondo (fig.7): il sottotipo A è presente in aree dell'Africa Centrale e Orientale e nei paesi dell'Europa dell'Est; la CRF 02_AG circola soprattutto nell'Africa Occidentale; il clade B (HIV-1 B) predomina nell'Europa Occidentale, nelle Americhe e in Australia [98, 103].

Le conoscenze sulla patogenesi dell'infezione da HIV-1, sulla proteina regolatoria Tat, così come lo sviluppo dei trattamenti terapeutici antiretrovirali si basano soprattutto sullo studio del sottotipo virale B. Sottotipo B responsabile del solo 10% delle infezioni virali presenti a livello mondiale, al contrario il clade C (HIV-1 C), diffuso nei paesi dell'Africa del Sud e Orientale, dove è presente il più grande focolaio epidemico di infezione da HIV-1, e in Asia, è causa di oltre il 50% delle infezioni registrate nel mondo [98, 103].

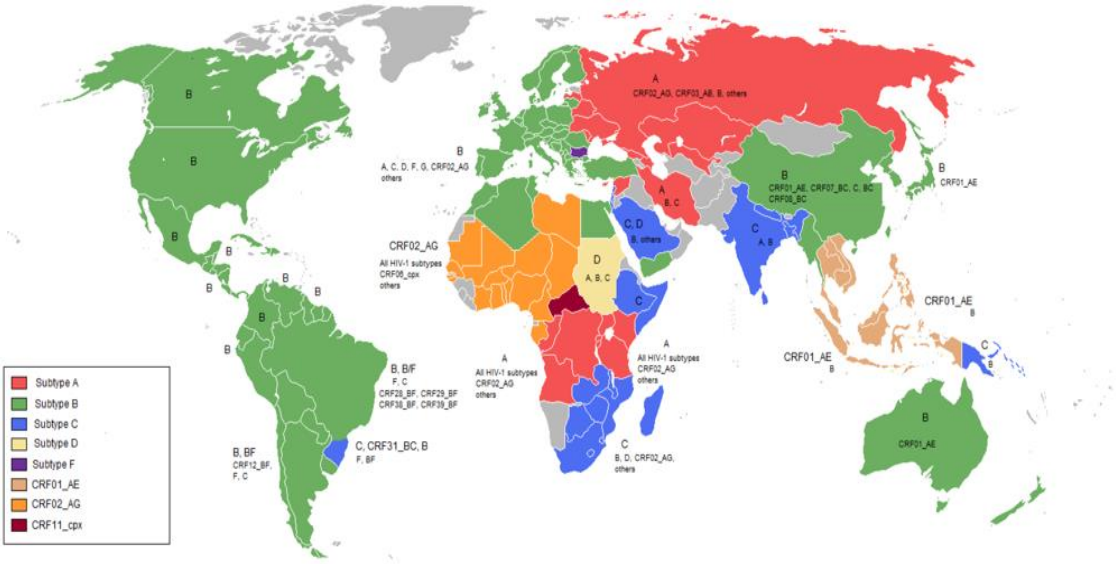


Figura 7. Distribuzione mondiale dei principali sottotipi e ricombinanti del virus HIV-1.

Le variazioni genetiche tra i sottotipi del virus HIV-1 implicano loro differenti proprietà biologiche, quindi un diverso comportamento in termini di replicazione, diffusione e progressione dell'infezione e risposta ai trattamenti terapeutici, evidenziabile in particolare, tra il clade virale B e C [99, 100].

Per ciò che concerne la proteina regolatoria Tat nei diversi clade, questa è oggetto di variazioni a livello della sequenza amminoacidica [104] che possono riflettersi su cambiamenti strutturali e funzionali, con ripercussioni sulle caratteristiche patogenetiche delle varianti virali.

Importanti differenze amminoacidiche sono state identificate tra la proteina Tat di HIV-1 B e HIV-1 C (fig.8).

Figura 8. Sequenze amminoacidiche delle varianti della proteina Tat di HIV-1 B e HIV-1 C.
Il clone HXB2 è rappresentativo del sottotipo virale B (Tat GenBank ID: AAB50256) [105]; 93IN è un clone HIV-1 C isolato in India (Tat GenBank ID: BAA85229) [106]; 96BW1210 (Tat GenBank ID: AAD17114) e 96BW15B03 (Tat GenBank ID: AAD17120) sono entrambi isolati virali HIV-1 C del Botswana [107].

A differenza della Tat del clade B (B-Tat) di cui sono presenti varianti con una lunghezza di 86 aminoacidi, gli isolati di HIV-1 C presentano una proteina Tat costituita da 101 residui amminoacidici.

Nella Tat clade C (C-Tat), a livello del dominio N-terminale è frequente la presenza dell'Asparagina (Asn, N) in posizione 7 e 12 in sostituzione dell'Arginina e della Lisina (fig.8) [108]: è stato descritto come tali sostituzioni sono responsabili di una ridotta immunogenicità della regione N-terminale della C-Tat rispetto alla proteina Tat del sottotipo virale B [61].

Variazioni riguardanti, invece, la regione ricca di cisteine, è importante la presenza della Serina (Ser, S) in posizione 31 a livello della C-Tat che sostituisce la Cisteina (Cys, C) della B-Tat (fig.8): la presenza del motivo Cys30-Ser31 (C30S31) è responsabile di una moderata azione neurotossica [109-111] e di una riduzione dell'attività chemiotattica della C-Tat rispetto alla B-Tat, ciò che ne consegue è una inibizione della migrazione e infiltrazione dei monociti a livello del cervello, con minor danni neuronali nelle infezioni da HIV-1 C [109, 112].

Della proteina C-Tat sono note due varianti con differenze che interessano la posizione 31 (fig.8): la variante C-Tat con il motivo C30S31, di cui appena discusso, molto frequente tra gli isolati HIV-1 C identificati, in particolare, in Asia e la C-Tat che mantiene il motivo dicisteinico Cys30-Cys31 (C30C31) proprio della B-Tat, individuata in circa il 26% degli isolati virali di tipo clade C presenti nei paesi dell'Africa del Sud [113].

La proteina C30C31 C-Tat, come la proteina regolatoria del clade virale B, mostra una forte azione chemiotattica tale da contribuire a danni neurologici rilevanti, la cui incidenza è alta tra i casi di infezione da HIV-1 C dell'area sud-africana [113].

In aggiunta, la presenza della Serina in posizione 57 e di Glutammato in posizione 63 a livello della C-Tat (fig.8) [104], in sostituzione dell'Arginina e Glutammina (Gln, Q) proprie della proteina B-Tat, sembra incidere su una sua maggiore attività di transattivazione rispetto alla Tat del clade B [114]; inoltre, il motivo QGD nella regione C-terminale della proteina C-Tat (fig.8), molto frequente soprattutto tra gli isolati virali asiatici, invece della sequenza RGD della B-Tat, sembra contribuire all'incremento dell'azione transattivante contemporaneamente a una riduzione dell'effetto apoptotico della Tat del sottotipo C rispetto alla proteina regolatoria del clade B [115].

Variazioni amminoacidiche, quindi, che incidono sui cambiamenti delle diverse attività biologiche della proteina C-Tat rispetto alla Tat del sottotipo virale B.

Poche informazioni, invece, si hanno sul comportamento della proteina Tat clade C come antigene virale oggetto della risposta immunitaria dell'ospite, nonché dell'effetto della risposta anticorpale rispetto alla progressione dell'infezione virale.

1.3 Scopo della tesi

Tenendo conto del ruolo che ricopre la proteina Tat come bersaglio del sistema immunitario dell'ospite, il lavoro sperimentale condotto è stato orientato all'analisi della risposta anticorpale anti-Tat nell'infezione virale naturale in relazione con i markers di monitoraggio del decorso dell'infezione: la carica virale (concentrazione di HIV RNA nel plasma), espressione dei livelli replicativi del virus; la conta linfocitaria T CD4+, il più importante marcatore di funzione del sistema immunitario e l'analisi dei livelli del DNA virale cellulare (HIV DNA), come marker di quantificazione del reservoir.

E' stato ampiamente descritto che la determinazione dei livelli di HIV DNA ha un importante valore prognostico circa la progressione della malattia e l'efficacia del trattamento terapeutico [116-119], specialmente nei pazienti con viremia non rilevabile per i quali l'HIV DNA può rappresentare il solo marcatore in grado di evidenziare l'attività del virus.

Nel dettaglio, siamo andati a valutare la risposta anticorpale anti-Tat rispetto alle diverse varianti della proteina regolatoria: la proteina Tat del sottotipo virale B e quella del clade C, della quale ne sono state prese in considerazione entrambe le varianti con diverso assetto cisteinico, C30S31 C-Tat e C30C31 C-Tat.

La sperimentazione ha richiesto, in primo luogo, la produzione per via ricombinante della proteina Tat clade C con il motivo dicisteinico C30C31, poiché non disponibile in commercio. In secondo luogo, si è resa necessaria la messa a punto di tre saggi immunoenzimatici, basati su metodica ***ELISA indiretta***, per valutare la risposta IgG specifica rispetto alle varianti di Tat prese in considerazione.

Nella fase di ottimizzazione dei tre test ELISA sono stati definiti i valori di riferimento degli standard (***controllo positivo***, ***controllo negativo*** e ***background***) ai fini della corretta calibrazione e verifica della riproducibilità di ciascun saggio immunoenzimatico ed è stato, così, possibile assegnare il ***cut-off*** di riferimento relativo a ciascun test per ogni antigene virale, importante per la classificazione dei soggetti analizzati.

E’ stata caratterizzata in una coorte di soggetti sieropositivi Europei la risposta IgG anti B-Tat e ne è stata valutata la sua influenza sui livelli di infezione virale.

Parallelamente, una coorte di sieropositivi Africani è stata oggetto di analisi per evidenziare la presenza e la cross-clade reattività di IgG Tat specifiche rispetto ai tre antigeni virali sopra indicati, nonché del ruolo della risposta umorale reattiva verso le varianti della Tat clade C nell’infezione virale, in comparazione con il ruolo della risposta IgG anti B-Tat.

CAPITOLO 2

Materiali e metodi

2.1 Campioni biologici

I campioni biologici utilizzati derivano da 123 pazienti HIV-1 positivi, reclutati durante i controlli di routine dei parametri ematologici effettuati dall'Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti Marche Nord" - Presidio Ospedaliero San Salvatore di Pesaro (Italia) che li ha successivamente messi a disposizione di questo studio.

Di questi, 102 sieropositivi sono stati classificati come Europei poichè hanno contratto l'infezione in Italia; 21 pazienti, invece, sono stati classificati come Africani, poichè hanno contratto l'infezione in diverse aree dell'Africa.

Da ogni paziente è stato raccolto sia un campione di sangue intero in EDTA per la procedura di quantificazione del DNA virale, sia plasma separato dalla fase cellulare per l'analisi delle risposte IgG anti-Tat.

Il sangue intero è stato prelevato e immediatamente congelato a -20°C.

L'ottenimento del plasma è stato effettuato da sangue intero, centrifugato a 3000 rpm per 10 minuti a 4°C; il plasma separato dalla fase cellulare è stato successivamente diluito 1:0.5 (v/v) in Buffer di lisi virale, costituito da Tris/HCl 30 mM pH 7.2, NaCl 450 mM, Triton X-100 1.5% (v/v), acido deossicolico 1.5% (w/v), SDS 0.3% (w/v), EDTA 10 mM e sodio azide (NaN_3) 0.02% (w/v) [120], per poi essere incubato a temperatura ambiente per 10 minuti. I campioni sono stati conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

Tutti i soggetti hanno espresso il loro consenso alla raccolta e alla conservazione dei propri campioni biologici per scopi di ricerca, nel rispetto dei principi della Dichiarazione di Helsinki. Tutto lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Azienda Ospedaliera "Ospedali Riuniti Marche Nord" dopo presentazione di un programma di ricerca definito e dettagliato.

In aggiunta, il personale medico è stato autorizzato a fornire le informazioni cliniche di ciascun paziente ai fini dello studio, mantenendo l'anonimato del paziente.
Ulteriori campioni di plasma di sieronegativi sono stati ottenuti da 77 volontari sani, presso il Centro Trasfusionale dell'Ospedale Santa Maria della Misericordia di Urbino (Italia), suddivisi in: 26 maschi, 23 femmine e 28 donne in gravidanza. Tutti i donatori hanno sottoscritto il consenso informato.
Abbiamo inoltre reclutato campioni di plasma da 10 donatori sani per l'ottenimento delle immunoglobuline umane da utilizzare nei test ELISA come controllo negativo.
I campioni di plasma sono stati conservati a -20°C fino al momento dell'utilizzo.

2.2 Le proteine ricombinanti Tat clade B e C30S31 Tat clade C

Le proteine ricombinanti Tat clade B (Accession number: P69697.1) e C30S31 Tat clade C (Accession number: AAL06113.1) sono state prodotte e acquistate da catalogo Diatheva srl.

2.3 Clonaggio della proteina C30C31 C-Tat: mutagenesi sito-specifica

La sequenza nucleotidica della proteina C30C31 C-Tat è stata ottenuta mediante reazione di mutagenesi sito-specifica utilizzando il costrutto plasmidico pET-3d/C30S31 C-tat, precedentemente costruito clonando il frammento nucleotidico C30S31 C-tat di 306 bp tra i siti di restrizione 5' Nco I e 3' EcoR I (fig.11).
La reazione è stata eseguita utilizzando il Change-IT™ Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (Affimetrix USB®), in accordo con le specifiche di prodotto.
È stato impiegato il primer di mutagenesi 5'[Phos]-CATGTTATTGTAAAAAATGT**T**GCTACCARRGTCTAGTTTGC-3' (fig.11B), con una lunghezza

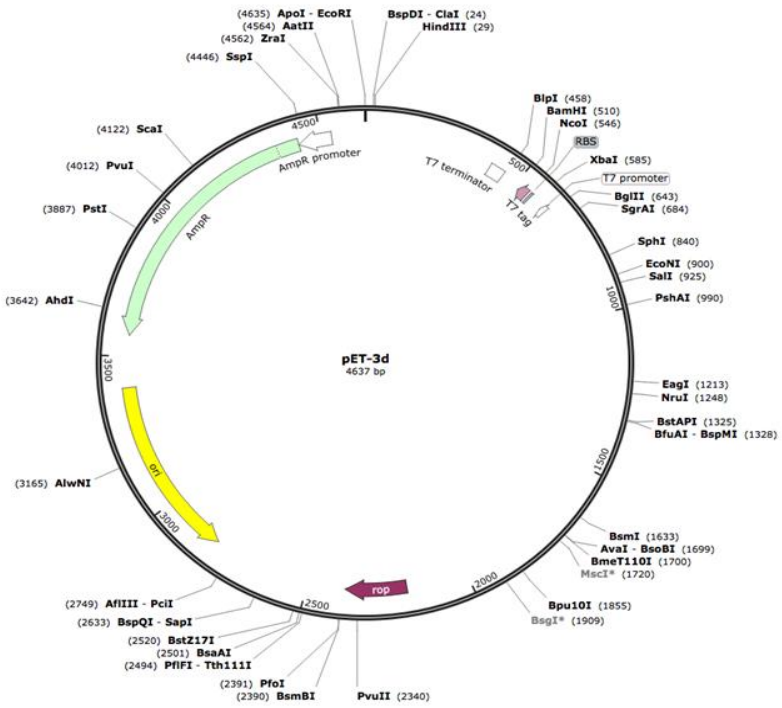
di 41 nucleotidi con mutazione in posizione simmetrica rispetto alle estremità, tale da permettere un buon appaiamento del primer nonostante la presenza del mismatch.

Come da protocollo, la reazione di mutagenesi è stata sottoposta a digestione con l'endonucleasi Dpn I, in grado di riconoscere ed eseguire il taglio a livello della sequenza specifica GATC quando l'Adenina (A) è metilata, in modo da procedere alla degradazione del plasmide parentale originariamente metilato, lasciando intatto il plasmide mutato non metilato, prodotto in vitro.

3 µl di reazione di mutagenesi, dopo digestione con Dpn I, sono stati trasformati in cellule batteriche competenti *E. coli* Nova Blue. Le cellule sono state seminate su terreno selettivo LB Agar (Luria Broth, preparato con NaCl 10 g/l, triptone 10 g/l, estratto di lievito 5 g/l, agar 15 g/l, pH 7.4) in presenza di ampicillina 50 µg/ml.

4 colonie sono state prelevate e inoculate in terreno liquido LB (NaCl 10 g/l, triptone 10 g/l, estratto di lievito 5 g/l) in presenza di ampicillina 50 µg/ml, per poi procedere all'estrazione del DNA plasmidico, utilizzando il QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), e all'analisi di sequenza per verificare l'avvenuta mutagenesi in forma corretta.

A



B

NcoI

CCATGGAGCCAGTAGATCCTAACCTAGAGCCCTGGAACCATCCAGGAAGTCAGCCT

Met Glu Pro Val Asp Pro Asn Leu Glu Pro Trp Asn His Pro Gly Ser Gln Pro

5'[Phos]-CATGTTATTGTAAAAAATGTTGCTACCATTGTCTAGTTTGC-3'

AAAACTGCTTGTAATACATGTTATTGTAAAAAATGTAGCTACCATTGTCTAGTTTGC

Lys Thr Ala Cys Asn Thr Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Ser Tyr His Cys Leu Val Cys

TTTCAGACAAAAGGCTTAGGCATTTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGA

Phe Gln Thr Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

AGCGCTCCTCCAAGCAGTGAGGATCATCAAAATCCTATATCAAAGCAGCCCTTACCC

Ser Ala Pro Pro Ser Ser Glu Asp His Gln Asn Pro Ile Ser Lys Gln Pro Leu Pro

AGAACCCAAGGGGACCCGACAGGCTCAGAGGAATCGAAGAAGAAGGTGGAGAGCAAG

Arg Thr Gln Gly Asp Pro Thr Gly Ser Glu Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Ser Lys

EcoRI

ACAGAGACAGATCCGTTCGACTAAGAATTC

Thr Glu Thr Asp Pro Phe Asp Stop

Figura 11. (A) Vettore pET-3d. (B) Sequenza nucleotidica e amminoacidica della proteina C30S31 C-Tat (Accession number: AAL06113.1).

2.4 Espressione e purificazione della proteina ricombinante C30C31 Tat clade C

La proteina C30C31 C-Tat è stata espressa in cellule batteriche *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, trasformate con il plasmide pET-3d/C30C31 C-tat.

Una colonia di *E. coli* pET-3d/C30C31 C-tat BL21 (DE3) pLysS è stata inoculata in 100 ml di terreno LB addizionato con ampicillina 50 µg/ml e cloramfenicolo 34 µg/ml, mantenuta per 16 ore a 37°C in costante agitazione. Dopo tale tempo, la crescita batterica è stata monitorata valutando l'assorbanza (Abs) alla lunghezza d'onda di 600 nm.

La coltura batterica è stata diluita in 2 l di terreno LB, completato sempre con ampicillina 50 µg/ml e cloramfenicolo 34 µg/ml, in modo da ottenere una densità cellulare con un'Abs a 600 nm di circa 0.1. L'inoculo è stato messo ad incubare nuovamente a 37°C in costante agitazione; la crescita cellulare è stata monitorata leggendo le Abs a 600 nm ad intervalli di 30 minuti.

L'espressione della proteina è stata indotta al raggiungimento di un'assorbanza a 600 nm pari a 0.6, aggiungendo IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 1 mM alla coltura batterica.

La crescita è stata quindi nuovamente monitorata come sopra descritto, ogni 60 minuti.

Dopo 3 ore dall'induzione, le cellule batteriche sono state recuperate e successivamente centrifugate a 7000 rpm per 30 minuti a 4°C. Il pellet ottenuto è stato risospeso in Tampone di lisi costituito da: tampone fosfato 20 mM, PMSF 1 mM, mannitolo 50 mM, NaCl 0.1 M, DTT 1 mM, glicerolo 2.5% (v/v), pH 7.5.

La lisi batterica è stata effettuata utilizzando il French Press (EmulsiFlex C5); il campione è stato mantenuto in ghiaccio e poi centrifugato a 14000 rpm per 30 minuti a 4°C.

Il sopranatante, contenente la maggior quantità di proteina solubile, è stato utilizzato per la fase di purificazione della proteina.

La proteina ricombinante è stata purificata eseguendo 2 step cromatografici in tandem, utilizzando il sistema automatizzato ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences).

È stata eseguita una prima cromatografia a scambio ionico rappresentata da una matrice DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences). La colonna è stata prima equilibrata con Tampone A costituito da tampone fosfato 20 mM, mannitolo 50 mM, NaCl 0.1 M, DTT 1 mM, glicerolo 2.5% (v/v), pH 7.5 e poi caricata con il surnatante, ad un flusso di 2 ml/min. Successivamente, è stato eseguito un primo lavaggio della matrice con Tampone A, seguito da un lavaggio con Tampone A + NaCl 0.2 M (Tampone B).

La proteina è stata eluita utilizzando Tampone A + NaCl 1 M (Tampone C).

Si è poi passati ad effettuare un secondo step di purificazione costituito da una cromatografia di affinità basata su Eparina.

Le frazioni contenenti Tat, derivanti dalla prima cromatografia, sono state riunite, diluite 1:2 (v/v) con Tampone D preparato con tampone fosfato 20 mM, mannitolo 50 mM, DTT 1 mM, glicerolo 2.5% (v/v), pH 7.5 e caricate in colonna Heparin Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences) ad un flusso di 2 ml/min, precedentemente equilibrata in Tampone A + NaCl 0.5 M (Tampone E).

Dopo un primo lavaggio della matrice con Tampone E, è stata eseguita una fase di purificazione a step di gradiente facendo flussare in colonna concentrazioni crescenti di NaCl pari a 1 M, 1.2 M e 2 M.

La proteina eluita è stata sottoposta ad una fase di concentrazione mediante ultrafiltrazione/diafiltrazione con Centricon® Centrifugal Unit 10,000 MWCO (Millipore). Durante l'ultima fase di concentrazione, la proteina ha subito anche un cambio di tampone al fine di ottenerla in un buffer ideale alla sua conservazione, costituito da: tampone fosfato 20 mM, mannitolo 50 mM, DTT 1mM, glicerolo 2.5% (v/v), pH 7.5.

La concentrazione proteica è stata determinata con il metodo di Bradford [121]. L'espressione, tutte le fasi della purificazione e il grado di purezza della proteina sono

state monitorate tramite SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

La proteina è stata congelata a -80°C, suddivisa in aliquote.

2.5 Caratterizzazione della proteina ricombinante C30C31 C-Tat: Western Immunoblotting e test ELISA

Per identificare e caratterizzare la proteina in condizioni denaturanti è stata effettuata un'analisi Western Immunoblotting.

La proteina C30C31 C-Tat è stata bollita per 5 minuti in Sample buffer [Tris/HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 2% (w/v), glicerolo 4% (v/v), β-MSH 4% (v/v)], risolta mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 14% e trasferita su membrana di nitrocellulosa da 0.22 μm (BIORAD). La membrana è stata saturata con Blocking solution [latte in polvere 5% (w/v) disciolto in Tris 50 mM e NaCl 150 mM pH 7.4 (TBS)] a temperatura ambiente per 60 minuti; successivamente, è stata inserita nel sistema Miniblotter 16 (Immunetics) per eseguire una titolazione dell'anticorpo primario policlonale Rabbit Anti HIV-1 Tat (Diatheva srl) [diluizioni seriali da 1:50 (v/v) a 1:409600 (v/v)] o dell'anticorpo primario monoclonale Mouse Anti HIV-1 Tat (clone 1D9D5) (Diatheva srl), reattivo rispetto alla regione aa 1-20 della proteina Tat [diluizioni seriali da 1:10 (v/v) a 1:81920 (v/v)] [122].

La varie diluizioni anticorpali, precedentemente preparate in Blocking solution, sono state erogate 200 μl/pozzetto.

Le membrane sono state incubate overnight a 4°C e successivamente lavate con TBS addizionato con Tween 20 (Sigma Aldrich) 0.1% (v/v) (TTBS).

È stato impiegato come anticorpo secondario un Goat anti Rabbit-HRP (horseradish peroxidase) conjugated (BIORAD) diluito 1:3000 (v/v) o un Goat anti Mouse-HRP conjugated (BIORAD) diluito 1:2000 (v/v). L'anticorpo di detection è stato diluito in TTBS completato con latte in polvere 5% (w/v) e mantenuto 60 minuti a temperatura ambiente.

Dopo opportuni lavaggi, l'attività della perossidasi è stata rilevata con il substrato "*enhanced chemiluminescence*" (ECL), utilizzando il kit ECL Star (EuroClone).

Le membrane sono state esposte a lastre fotografiche Chemiblue X Ray Film (Immunological Sciences) per evidenziare gli immunocomplessi.

Con metodica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) è stata identificata e caratterizzata la proteina ricombinante purificata in condizioni native.

100 ng per pozzetto di proteina Tat, diluita 1 µg/ml in tampone carbonato 0.05 M pH 9.6-9.8, sono stati adsorbiti su micropiastra da 96 pozzetti a media capacità di binding (Immulon 1B® Flat Bottom Microtiter Plates, Thermo Scientific), incubata overnight a 4°C.

Dopo 4 lavaggi con PBS 1X pH 7.4 supplementato con Tween 20 0.05% (v/v) (TPBS), i pozzetti sono stati saturati con 100 µl di BSA (bovine serum albumin, Sigma Aldrich) 1% (w/v) disciolta in TPBS (Blocking solution), la piastra è stata mantenuta a 37°C per 60 minuti e quindi sottoposta di nuovo a lavaggio.

Sono state preparate 16 diluizioni seriali in Blocking solution ed erogate 100 µl per pozzetto, in duplicato, sia dell'anticorpo primario policlonale Rabbit Anti HIV-1 Tat (Diatheva srl) [da 1:50 (v/v) a 1:1638400 (v/v)] sia del monoclonale Mouse Anti HIV-1 Tat (clone 1D9D5) (Diatheva srl) [da 1:12.5 (v/v) a 1:409600 (v/v)].

Gli anticorpi primari sono stati incubati a 37°C per 60 minuti.

La fase di lavaggio con TPBS è stata seguita dall'incubazione della piastra a 37°C per 60 minuti con gli anticorpi di detection Goat anti Rabbit-HRP conjugated (BIORAD) o Goat anti Mouse-HRP conjugated (BIORAD), diluiti entrambi 1:1000 (v/v) in Blocking solution ed erogati 100 µl/pozzetto.

Gli immunocomplessi sono stati rilevati aggiungendo 100 µl per pozzetto della soluzione cromogenica, preparata disciogliendo 1 tablet da 5 mg di 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS, Roche) in 12.5 ml di tampone sodio citrato 0.05 M pH 3.0 e completata con 12.5 µl di H_2O_2 (Sigma Aldrich).

La piastra è stata incubata per 45 minuti a temperatura ambiente, protetta dalla luce; l'intensità della colorazione sviluppatasi è stata valutata mediante lettura dell'assorbanza a 405 nm con microplate reader (BIORAD).

Contemporaneamente alla caratterizzazione della proteina C30C31 C-Tat, sono state analizzate sia in Western Immunoblotting che in test ELISA le proteine Tat clade B e C30S31 clade C.

2.6 Ottimizzazione del test ELISA

2.6.1 Preparazione del controllo negativo: purificazione delle IgG umane (HIgG) da campioni di plasma di soggetti sani

Le IgG umane (HIgG) sono state utilizzate come ***controllo negativo*** (CTR-) nei saggi immunoenzimatici per la determinazione delle Immunoglobuline anti-Tat.

Le IgG umane sono state purificate da plasma di donatori sani, reclutato dal Centro Trasfusionale dell'Ospedale Santa Maria della Misericordia di Urbino (Italia), tramite una cromatografia di affinità basata su Proteina A.

In questo tipo di cromatografia viene sfruttata la capacità della Proteina A del batterio Staphylococcus aureus di legare la regione costante Fc degli anticorpi.

Ai fini della purificazione è stata utilizzata una colonna con resina Proteina A-Sepharose (Sigma Aldrich). La resina è stata prima equilibrata con tampone fosfato 0.1 M pH 8.0 e poi caricata con il campione diluito 1:2 (v/v) in tampone fosfato 0.1 M pH 8.0 e filtrato con membrana da 0.45 µm a bassa ritenzione proteica. Il caricamento del campione è stato seguito dalla fase di lavaggio della colonna, sempre con tampone fosfato 0.1 M pH 8.0, per poi passare all'eluizione delle immunoglobuline con tampone sodio citrato 0.1 M pH 3.0. Sono state raccolte 15 frazioni di eluato, di ciascuna è stata letta l'Abs a 280 nm allo spettrofotometro (Kontron UVIKON®860 Spectrophotometer): sono state riunite le frazioni con valore di Abs maggiore di 0.5.

Il pH del riunito è stato portato alla neutralità con Tris base 1 M.

La concentrazione del campione è stata determinata mediante valutazione dell'Abs a 280 nm e calcolata utilizzando il coefficiente di estinzione molare delle IgG pari a ε=1.35.

Le HIgG purificate sono state conservate in aliquote a -20°C.

2.6.2 Preparazione del controllo positivo

I saggi ELISA per la valutazione delle IgG reattive verso i tre antigeni virali sono stati corredati di un ***controllo positivo*** (CTR+) interno, necessario per la valutazione della funzionalità del sistema immunoenzimatico.

Al fine di ottenere un controllo riproducibile e senza potenziale infettivo, sono state studiate molecole bifunzionali ottenute mediante "*cross-linkage*" tra IgG anti-Tat di coniglio e IgG umane, utilizzando come agente "*cross-linker*" la glutaraldeide.

La glutaraldeide è un cross-linker omo-bifunzionale presentante due gruppi aldeidici terminali, coinvolti in legami covalenti stabili con gruppi amminici di due diverse molecole [123].

Ai fini della preparazione del controllo positivo sono stati utilizzati l'anticorpo policlonale (pAb) Rabbit Anti HIV-1 Tat (Diatheva srl) e immunoglobuline G umane purificate, ottenute come descritto nel paragrafo 2.6.1.

È stata preparata una miscela di immunoglobuline con ratio pAb anti-Tat/HIgG pari a 1:0.03 (w/w); una volta stimato il volume della preparazione, è stata definita la quantità di Glutaraldeide solution [glutaraldeide 2.3% (v/v) in HEPES buffer 20 mM pH 7.5] da aggiungere secondo la relazione: 5 µl di Glutaraldeide solution per ogni 100 µl di soluzione di immunoglobuline.

La reazione di cross-linkage è stata mantenuta per 5 minuti a 37°C in agitazione, per poi essere stoppata con Tris/HCl 1 M pH 8.0 (Stop solution). È stato valutato il volume della soluzione per determinare la quantità di tampone da erogare, rispettando la relazione: 10 µl di Stop solution per ogni 100 µl di soluzione.

Il campione è stato conservato in aliquote a -80°C.

Per valutarne la riproducibilità, il controllo positivo è stato preparato in tre lotti distinti (usando tre diversi lotti di anticorpo policlonale anti-Tat) processati e mantenuti tutti alle stesse condizioni.

2.6.3 Caratterizzazione del controllo positivo

La caratterizzazione del controllo positivo è stata fatta mediante test ELISA, valutando la sua capacità di legarsi alle tre varianti Tat e quella di essere riconosciuto contemporaneamente da un anticorpo di detection anti immunoglobuline G umane; inoltre, ne è stata determinata la sua stabilità.

A tal fine gli antigeni Tat sono stati fatti aderire alla superficie di micropiastre a media efficienza di legame (Immulon® 1B Flat Bottom Microtiter Plates, Thermo Scientific): ogni proteina è stata diluita alla concentrazione finale di 1 µg/ml in tampone carbonato 0.05 M pH 9.6-9.8 e sono stati erogati, per ciascuna preparazione, 100 µl a pozzetto. L'adsorbimento (coating) è stato favorito con una incubazione a 4°C overnight.

Dopo 4 lavaggi con TPBS [PBS 1X pH 7.4 + Tween 20 0.05% (v/v)], i pozzetti sono stati saturati con 350 µl di BSA 2% (w/v) in TPBS (Blocking solution), mantenendo la piastra a 37°C per 60 minuti in incubatore.

Del controllo positivo sono state preparate 8 diluizioni seriali [da 1:10 (v/v) a 1:1280 (v/v)] in PBS 1X pH 7.4 addizionato con Proclin 300 (Sigma Aldrich) 0.02% (v/v) e BSA 0.5% (v/v) (Buffer A_1). Dopo lavaggio della piastra, sono stati erogati 100 µl a pozzetto di ogni diluizione, in duplicato. Ha fatto seguito un'incubazione a 37°C per 60 minuti e successivo step di lavaggio, quindi sono stati erogati 100 µl per pozzetto di Goat anti Human IgG Fc specific-HRP conjugated (Meridian Life Science, ®Inc.) diluito 1:8000 (v/v) in PBS 1X pH 7.4 completato con Proclin 300 0.02% (v/v), Tween 20 0.05% (v/v) e BSA 2% (w/v) (Buffer A_2). L'anticorpo secondario è stato mantenuto sempre per 60 minuti a 37°C; successivamente sono stati eseguiti 4 lavaggi con TPBS.

Per la fase di detection, sono stati distribuiti 100 µl/pozzetto di soluzione cromogenica (12.5 ml di tampone sodio citrato 0.05 M pH 3.0 + 1 tablet di ABTS + 12.5 µl H_2O_2) ed è stata valutata l'Abs a 405 nm dopo 45 minuti con microplate reader.

I test di stabilità sono stati effettuati con la stessa metodica ELISA sopra descritta, determinando l'attività dei tre lotti del controllo positivo ad intervalli di tempo di 1, 15, 30, 60 e 90 giorni dalla loro preparazione e congelamento a -80°C.
Le determinazioni sono state effettuate contemporaneamente su piastre sensibilizzate con le tre varianti di Tat.

2.6.4 Definizione del cut-off

77 campioni di plasma di donatori sani sono stati testati in triplicato su tre saggi immunoenzimatici indipendenti, al fine di determinare il valore di ***cut-off*** di riferimento del saggio, rispetto a ciascuna delle tre varianti della proteina Tat prese in esame.
Per ogni prova eseguita sono state preparate tre micropiastre con adsorbiti gli antigeni virali alla concentrazione di 1 µg/ml, come descritto in precedenza.
Le piastre sono state bloccate erogando 350 µl per pozzetto di Blocking solution [TPBS + BSA 2% (w/v)], incubandole per 60 minuti a 37°C. Dopo 4 lavaggi con TPBS, sono stati distribuiti i campioni di plasma.
I campioni di plasma sono stati diluiti 1:50 (v/v) in Buffer A, preparato partendo da due stock solution:

- 1° stock solution BSA 2% (w/v), ottenuta addizionando al PBS 1X pH 7.4 il Proclin 300 0.02% (v/v) e BSA 2% (w/v)
- 2° stock solution HSA 4% (v/v), ottenuta addizionando al PBS 1X pH 7.4 il Proclin 300 0.02% (v/v) e HSA (Human Albumin Grifols® 20%) 4% (v/v).

Alle due soluzioni miscelate 1:1 (v/v) è stato aggiunto Tween 20 0.05% (v/v).
I campioni sono stati erogati 100 µl per pozzetto, in triplicato.
È stato, inoltre, previsto l'inserimento degli standard: controllo negativo, controllo positivo e controllo del background.

In tre pozzetti gemelli sono stati distribuiti 100 µl di controllo negativo (HIgG) diluito 1:50 (v/v) in Buffer A_1 [PBS 1X pH 7.4 + Proclin 300 0.02% (v/v) + BSA 0.5% (w/v)], allo stesso modo è stato piastrato il controllo positivo, diluito 1:10 (v/v) sempre in Buffer A_1. La valutazione del background è stata eseguita erogando 100 µl, in triplicato, di solo Buffer A.

Dopo l'incubazione a 37°C per 60 minuti sono stati effettuati 4 lavaggi con TPBS, seguiti dall'incubazione, sempre a 37°C per 60 minuti, dell'anticorpo di detection Goat anti Human IgG-Fc specific-HRP conjugated (Meridian Life Science, ®Inc.) diluito 1:8000 (v/v) in Buffer A_2 [PBS 1X pH 7.4 + Proclin 300 0.02% (v/v) + Tween 20 0.05% (v/v) + BSA 2% (w/v)], 100 µl/pozzetto.

La successiva fase di lavaggio è stata seguita dalla rilevazione degli immunocomplessi: le piastre sono state incubate a temperatura ambiente per 45 minuti, protette dalla luce, in presenza di soluzione colorante (12.5 ml di tampone sodio citrato 0.05 M pH 3.0 + 1 tablet di ABTS + 12.5 µl H_2O_2) per poi procedere alla lettura dell'assorbanza a 405 nm.

Per ciascun campione è stato determinato il coefficiente di variazione (CV), calcolato come rapporto deviazione standard/media dei valori di Abs dei tre replicati, e il suo valore percentuale (%CV), come misura di precisione.

Secondo le linee guida internazionali, approvate dalla Food and Drug Administration [124], atte a validare le procedure analitiche, i valori di %CV non devono eccedere il 20%. È stato assunto il %CV <20% e il valore di cut-off è stato determinato come valore medio di assorbanza dei campioni negativi con %CV <20% maggiorato del valore di deviazione standard (SD) moltiplicato per un fattore 3 [125, 126].

L'intera procedura descritta è stata eseguita sui tre antigeni assegnando un cut-off per la proteina B-Tat, la C30S31 C-Tat e la C30C31 C-Tat.

2.7 Valutazione della risposta IgG anti B-Tat/C30S31 C-Tat/C30C31 C-Tat

I saggi immunoenzimatici sono stati eseguiti secondo il protocollo ELISA definito precedentemente e descritto nel paragrafo 2.6.4. La funzionalità del sistema è stata verificata tramite l'inserimento degli standard (controllo positivo, controllo negativo e background), secondo le modalità previste dal protocollo.

I campioni di plasma dei pazienti HIV-1 positivi sono stati diluiti da 1:50 (v/v) a 1:400 (v/v) in Buffer A, ciascuna diluizione è stata valutata in triplicato.

Sono stati definiti positivi, quindi presentanti IgG anti-Tat "detectable", i plasma con Abs a 405 nm alla diluizione 1:50 (v/v) maggiore del cut-off di riferimento.

È stato, inoltre, valutato il titolo anticorpale inteso come reciproco della diluizione più alta presentante un valore di assorbanza maggiore del cut-off di riferimento.

2.8 Western Immunoblotting per la detection degli anticorpi anti-Tat

I campioni di plasma dei pazienti HIV-1 positivi Africani sono stati ulteriormente sottoposti a valutazione della risposta IgG anti-Tat mediante analisi Western Immunoblotting.

I tre antigeni Tat (1 μg/proteina) sono stati risolti su gel di poliacrilammide al 14% mediante SDS-PAGE e trasferiti su membrana di nitrocellulosa, come riportato in precedenza. La membrana è stata saturata con latte in polvere 5% (w/v) disciolto in TTBS (Blocking solution), a temperatura ambiente per 60 minuti e successivamente incubata con il plasma diluito 1:50 (v/v) in Blocking solution, overnight a 4°C.

I lavaggi della membrana, effettuati con TTBS, sono stati seguiti dalla fase d'incubazione con l'anticorpo secondario Goat anti Human IgG-Fc specific-HRP conjugated (Meridian Life Science, ®Inc.) diluito 1:10000 (v/v) in Blocking solution.

La fase di detection è stata eseguita come descritto nel paragrafo 2.5.

2.9 Epitope-mapping degli anticorpi Tat specifici

Dei campioni IgG anti-Tat positivi è stata effettuata un'analisi epitope-mapping, mediante metodica ELISA indiretta, rispetto al dominio N-terminale e al dominio basico della proteina Tat.

Sono stati utilizzati due peptidi sintetici di 15 aminoacidi, presentanti sequenza amminoacidica della proteina Tat clade B: peptide dominio N-terminale (aa 1-15) MEPVDPRLEPWKHPG; peptide dominio basico (aa 46-60) SYGRKKRRQRRRPPQ.

I peptidi sono stati utilizzati come antigeni test.

Piastre da 96 pozzetti con alta efficienza di legame (MaxiSorp Nunc-Immuno Plate, Thermo Scientific) sono state sensibilizzate con 100 ng/pozzetto di antigene diluito 1 µg/ml in PBS 1X pH 7.4, overnight a 37°C. Le piastre, dopo 4 lavaggi con TPBS, sono state saturate con 100 µl/pozzetto di BSA 1% (w/v) in TPBS (Blocking solution), a 37°C per 60 minuti. Dopo il lavaggio della piastra, i campioni di plasma sono stati diluiti 1:50 (v/v) in Blocking solution, erogati 100 µl/pozzetto in triplicato e incubati a 37°C per 60 minuti.

Il successivo step di lavaggio è stato seguito dall'incubazione, a 37°C per 60 minuti, con l'anticorpo secondario Goat anti Human IgG-Fc specific-HRP conjugated diluito 1:8000 (v/v) in Blocking solution. La detection degli immunocomplessi è stata eseguita come descritto nei precedenti protocolli ELISA.

In tutti gli esperimenti sono stati inclusi 7 campioni di plasma negativi, processati come descritto sopra.

Ai fini dell'analisi dei dati, i valori di Abs relativi ai campioni dei soggetti sieropositivi sono stati sottratti del valore medio di Abs dei campioni di controllo.

2.10 Estrazione del DNA

Il DNA cellulare, comprendente sia il DNA genomico che il DNA virale, è stato isolato dai leucociti (WBC) partendo da 400 µl di sangue intero in EDTA, utilizzando il QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN), seguendo le indicazioni fornite dal produttore.

La concentrazione di DNA è stata determinata utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies); inoltre, sono stati valutati i rapporti di assorbanza 260/280 e 260/230 come controllo della purezza dei campioni: tutti i campioni sono stati accettati come DNA "puro", aventi un rapporto di circa 1.8 e 2.0, rispettivamente.

2.11 Quantificazione dell'HIV DNA cellulare

La quantificazione del DNA virale è stata eseguita mediante SYBR Green I real-time PCR.

È stato stabilito un volume finale di reazione di 50 µl, in cui 250-500 ng di DNA sono stati aggiunti alla master mix 2X Hot-Rescue Real Time PCR Kit-SG (Diatheva, srl) e a 100 nM di ciascun primer.

È stata utilizzata la seguente coppia di primer: il primer forward PBS 5'-TAGCAGTGGCGCCCGA-3' e il primer reverse PBS 5'-TCTCTCTCCTTCTAGCCTCCGC-3' [127, 128], responsabili dell'ottenimento di un prodotto di amplificazione di 161 bp, compreso tra la fine della sequenza U5 della regione LTR 5' e l'inizio della sequenza Gag-Pol di HIV-1. Di entrambi i primers è stata precedentemente verificata la specificità rispetto i diversi sottotipi di HIV-1 del gruppo M [127, 128].

È stato applicato il seguente profilo di amplificazione: attivazione della Taq polimerasi a 95°C per 10 minuti, seguita da 40 cicli di PCR costituiti da due step consistenti in denaturazione a 95°C per 15 secondi e annealing/estensione a 68°C per 35 secondi. L'amplificazione, l'acquisizione e l'analisi dei dati sono state effettuate utilizzando

l'Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System e il software Sequence Detection System (v1.4.0).

Il numero di copie è stato determinato tramite curva standard costruita utilizzando il plasmide pPBS, standard già in precedenza validato [127], del quale sono state eseguite diluizioni seriale in base dieci da 10 a 10^5, includendo anche le 2 copie [128].

Ciascun campione clinico è stato analizzato in quadruplicato, utilizzando 250 ng di DNA per pozzetto per un totale di 1 µg. Il risultato di ogni campione è stato ottenuto sommando il numero di copie delle 4 repliche ed espresso come numero di copie di HIV DNA/µg di DNA. I campioni risultati "undetectable" sono stati sottoposti ad una nuova analisi aumentando la quantità di DNA a 500 ng, in duplicato.

Ai fini dell'analisi dei dati, il numero di copie di DNA virale è stato espresso come numero di copie di HIV DNA/10^4 linfociti T CD4+. Assumendo che in un µg di DNA sono presenti 142857 WBC e nota la conta di WBC e di cellule CD4+ per µl di sangue intero, per ciascun campione il numero di copie di HIV DNA/10^4 linfociti T CD4+ è stato così calcolato [128]:

$$[(\text{n. copie}/\mu\text{g DNA})/(\text{CD4+}/\text{WBC} \times 142857\ \text{WBC})] \times 10^4\ \text{CD4+}$$

2.12 Determinazione dei sottotipi di HIV-1 dai pazienti provenienti dall'Africa

La determinazione dei sottotipi di HIV-1 è stata eseguita mediante analisi della sequenza nucleotidica della regione identificata come p6/p7 gag (nucleotidi 1817-2352; 535 bp) del genoma virale [129].

È stata eseguita una reazione di PCR utilizzando la coppia di primer BJ1 5'-TAGAAGAAATGATGACAGCATG-3' e BJ2 5'-CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT-3' [129]. 500 ng di DNA cellulare sono stati aggiunti alla mix di reazione (50 µl) contenente 25 µl di 2X PCR Master Mix (Diatheva srl), 100 nM di ciascun primer e 1.25 U di Taq polimerasi (Hot Rescue PLUS DNA Polymerase 250 U, Diatheva srl).

La reazione di PCR, eseguita utilizzando il termociclatore Applied Biosystems® GeneAmp PCR System 2700, ha previsto uno step di attivazione della polimerasi a 95°C per 10 minuti seguito da 40 cicli di amplificazione (denaturazione a 95°C per 30 secondi, annealing a 57°C per 30 secondi, estensione a 72°C per 1 minuto) e da un ciclo finale a 72°C per 5 minuti.

In tutti gli esperimenti sono stati analizzati i controlli negativi no DNA e no HIV.

I prodotti di amplificazione sono stati risolti mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%, estratti da gel utilizzando il QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ed usati come templato per la reazione di sequenziamento con il sequenziatore automatico ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), utilizzando i primers BJ1 e BJ2.

Le sequenze nucleotidiche sono state allineate con la sequenza del ceppo virale di riferimento HXB2 utilizzando il programma HIVAlign (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VIRALIGN/viralign.html) [130], per verificare che le sequenze rientrassero nella regione di interesse.

Le sequenze nucleotidiche p6/p7 gag sono state analizzate utilizzando 4 software online di genotipizzazione di HIV-1: COMET HIV-1 (http://www.comet.lih.lu) [131], jpHMM (http://www.jphmm.gobics.de) [132, 133], HIV Blast

(http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html) e NCBI Genotyping tool con il dataset di riferimento del 2009 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi) [134].
È stato attribuito come sottotipo del virus HIV-1 infettante il risultato concorde tra i 4 software di genotipizzazione.

2.13 Analisi dei dati

I dati ottenuti dall'esecuzione dei saggi ELISA sono stati elaborati con il software Microsoft Excel.
Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software GraphPad Prism 6.
Il Mann-Whitney test è stato utilizzato per eseguire le comparazioni tra due gruppi non appaiati, invece le comparazioni tra due gruppi di dati appaiati sono state effettuate utilizzando il Wilcoxon test. Il Friedman test è stato impiegato per eseguire comparazioni multiple tra tre o più gruppi di dati appaiati.
Il grado di correlazioni tra due variabili è stato definito tramite il test di correlazione di Spearman. La significatività statistica è stata accettata per valori di $p \leq 0.05$.

CAPITOLO 3

Risultati

3.1 Produzione e caratterizzazione della proteina ricombinante C30C31 Tat clade C

Come descritto nella sezione Materiale e metodi, cellule batteriche *E. coli* BL21 (DE3) pLysS sono state trasformate con il costrutto plasmidico pET-3d/C30C31 C-tat e utilizzate come sistema di espressione per l'ottenimento della proteina ricombinante C30C31 Tat clade C.

Come mostrato in figura 12, la produzione della proteina ricombinante si ha già dopo 1 h dall'induzione dell'espressione (fig.12, lane 3), raggiungendo i livelli più alti a 3 h (fig.12, lane 5). È evidente la localizzazione della proteina nella frazione solubile dell'estratto batterico (fig.12, lanes 6-8). La frazione solubile è stata quindi utilizzata per la purificazione tramite una prima cromatografia a scambio ionico (fig.13) seguita da una seconda cromatografia di affinità con Eparina come ligando (fig.14).

L'analisi in SDS-PAGE dei singoli step dell'intero processo di purificazione, mostrata in figura 15, ha permesso di individuare la presenza della sola proteina target nella frazione di eluizione da Eparina ottenuta con NaCl 1.2 M (fig.14c; fig.15, lane 9), evidenziando al contempo un parziale distacco della proteina dalla resina nella eluizione con NaCl 1 M (fig.14b; fig.15, lane 8), in concomitanza all'eliminazione di contaminanti.

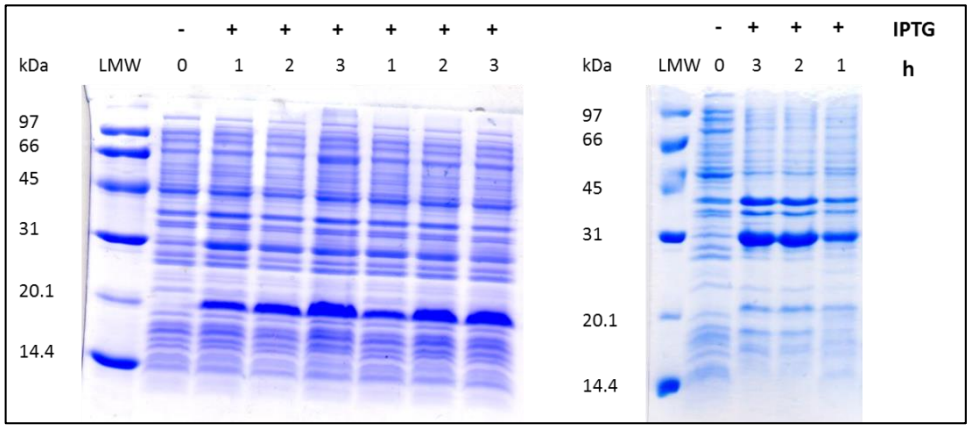


Figura 12. Analisi SDS-PAGE dell'espressione della proteina ricombinante C30C31 C-Tat.
Lanes 1-9: Standard di proteine a basso peso molecolare (LMW); lanes 2-10: Non indotto totale (20 µg); lane 3: Indotto totale a 1h dall'induzione (20 µg); lane 4: Indotto totale a 2h dall'induzione (20 µg); lane 5: Indotto totale a 3h dall'induzione (20 µg); lane 6: Frazione solubile a 1h dall'induzione (20 µg); lane 7: Frazione solubile a 2h dall'induzione (20 µg); lane 8: Frazione solubile a 3h dall'induzione (20 µg); lane 11: Frazione insolubile a 3h dall'induzione (20 µg); lane 12: Frazione insolubile a 2h dall'induzione (20 µg); lane 13: Frazione insolubile a 1h dall'induzione (20 µg).

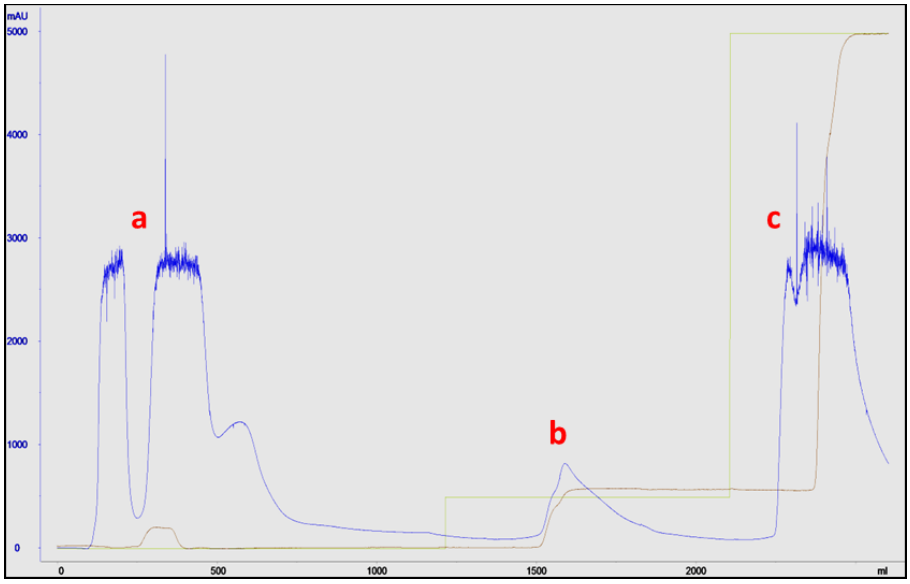


Figura 13. Profilo cromatografico DEAE Sepharose Fast Flow. a) Non legato da DEAE Sepharose Fast Flow; b) Lavaggio con NaCl 0.2 M; c) Eluizione con NaCl 1 M.

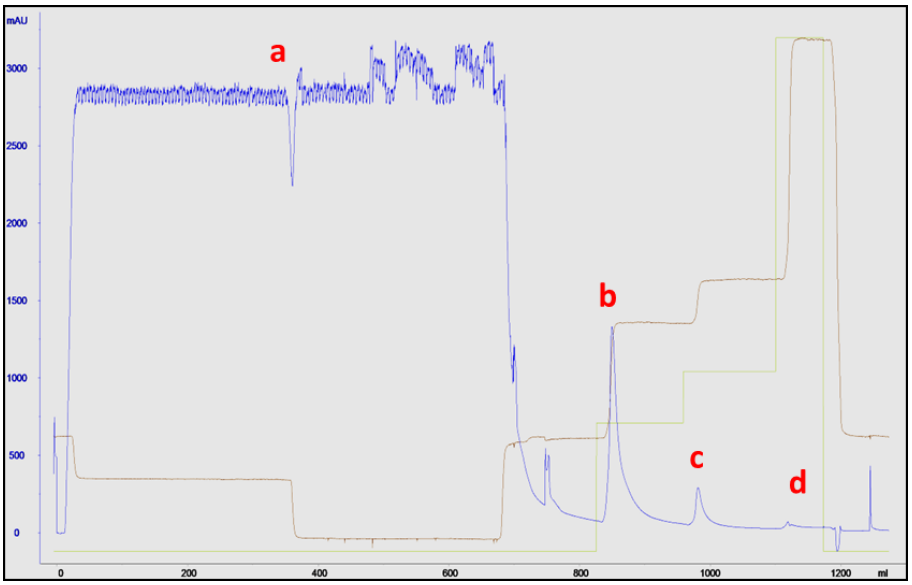


Figura 14. Profilo cromatografico Heparin Sepharose 6 Fast Flow. a) Non legato da Heparin Sepharose 6 Fast Flow; b) Eluizione con NaCl 1 M; c) Eluizione con NaCl 1.2 M; d) Eluizione con NaCl 2 M.

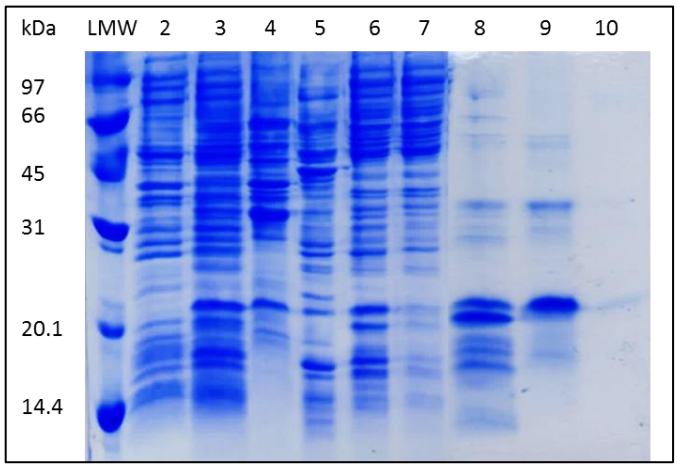


Figura 15. Analisi SDS-PAGE del processo di purificazione della proteina ricombinante C30C31 C-Tat. Lane 1: Standard di proteine a basso peso molecolare (LMW); lane 2: Non indotto totale (20 µg); lane 3: Frazione solubile a 3h dall'induzione (20 µg); lane 4: Non legato DEAE (20 µg); lane 5: Lavaggio DEAE NaCl 0.2 M (20 µg); lane 6: Eluizione DEAE NaCl 1 M (20 µg); lane 7: Non legato Heparin (20 µg); lane 8: Eluizione Heparin NaCl 1 M (20 µg); lane 9: Eluizione Heparin NaCl 1.2 M (20 µg); lane 10: Eluizione Heparin NaCl 2 M (30 µl).

La proteina purificata C30C31 Tat clade C, la cui sequenza amminoacidica è mostrata in figura 16 accanto alle sequenze delle varianti Tat clade B e C30S31 Tat clade C, presenta la stessa mobilità elettroforetica della variante C30S31 C-Tat, come è evidente in figura 17 lanes 3-4, inoltre è stata identificata, in analisi Western Immunoblotting, dagli anticorpi policlonale e monoclonale anti-Tat prodotti con il clade B di Tat (fig.18 A e B). L'interazione antigene-anticorpo è stata verificata anche sulle forme C30S31 C-Tat (fig.19 A e B) e B-Tat (fig.20 A e B).

L'analisi Western Immunoblotting ha permesso di evidenziare la formazione di multimeri a più bassa mobilità elettroforetica rispetto alla forma monomerica a 20.1 kDa della proteina C30C31 C-Tat, persistenti nonostante le condizioni operative denaturanti (fig.18 A e B). Multimeri sono stati individuati anche per le proteine C30S31 C-Tat (fig.19 A e B) e B-Tat come bande fortemente immunoreattive dopo staining con l'anticorpo policlonale (fig.20 A).

La proteina C30C31 C-Tat viene altrettanto riconosciuta dall'anticorpo policlonale in condizioni native, come verificato in test ELISA. L'anticorpo presenta un profilo di titolazione simile a quanto valutato per la proteina B-Tat nello stesso saggio (fig.21 A); lievemente più bassa è, invece, l'immunoreattività verso la forma C30S31 C-Tat (fig.21 A). Anche l'anticorpo monoclonale riconosce la proteina C30C31 C-Tat pur mostrando immunoreattività minore, così come sulla variante C30S31 C-Tat, rispetto a quella evidenziata sulla B-Tat (fig.21 B).

Tat clade B (Accession number: P69697.1)

```
          10                  20                  30                  40                  50                  60
MEPVDPRLEP WKHPGSQPKT ACTNCYCKKC CFHCQVCFIT KALGISYGRK KRRQRRRPPQ

          70                  80
GSQTHQVSLS KQPTSQSRGD PTGPKE
```

C30S31 Tat clade C (Accession number: AAL06113.1)

```
          10                  20                  30                  40                  50                  60
MEPVDPNLEP WNHPGSQPKT ACNTCYCKKC SYHCLVCFQT KGLGISYGRK KRRQRRSAPP

          70                  80                  90                  100
SSEDHQNPIS KQPLPRTQGD PTGSEESKKK VESKTETDPF D
```

C30C31 Tat clade C

```
          10                  20                  30                  40                  50                  60
MEPVDPNLEP WNHPGSQPKT ACNTCYCKKC CYHCLVCFQT KGLGISYGRK KRRQRRSAPP

          70                  80                  90                  100
SSEDHQNPIS KQPLPRTQGD PTGSEESKKK VESKTETDPF D
```

Figura 16. Sequenze amminoacidiche delle tre varianti della proteina Tat.

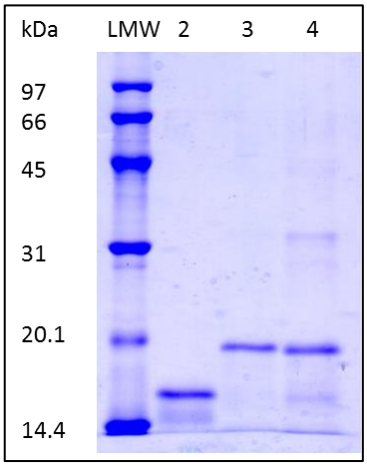


Figura 17. Valutazione in SDS-PAGE delle tre varianti della proteina Tat. Lane 1: Standard di proteine a basso peso molecolare (LMW); lane 2: Proteina Tat clade B (5 µg); lane 3: Proteina C30S31 Tat clade C (5 µg); lane 4: Proteina C30C31 Tat clade C (5 µg).

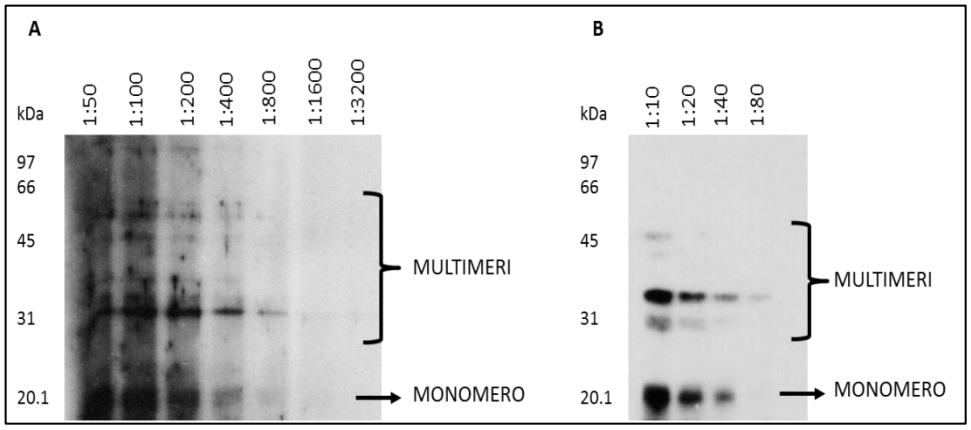


Figura 18. Immunoreattività in Western Immunoblotting della proteina C30C31 Tat clade C: (A) Anticorpo policlonale anti-Tat; (B) Anticorpo monoclonale anti-Tat. Sono stati risolti su gel di poliacrilammide e trasferiti su membrana di nitrocellulosa 20 µg di proteina, tale da avere una distribuzione di 1.25 µg/lane di antigene.

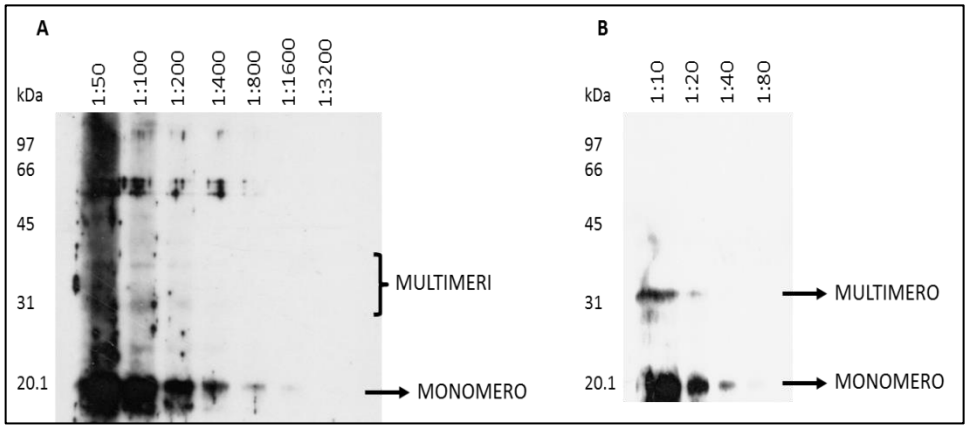


Figura 19. Immunoreattività in Western Immunoblotting della proteina C30S31 Tat clade C: (A) Anticorpo policlonale anti-Tat; (B) Anticorpo monoclonale anti-Tat. Sono stati risolti su gel di poliacrilammide e trasferiti su membrana di nitrocellulosa 20 µg di proteina, tale da avere una distribuzione di 1.25 µg/lane di antigene.

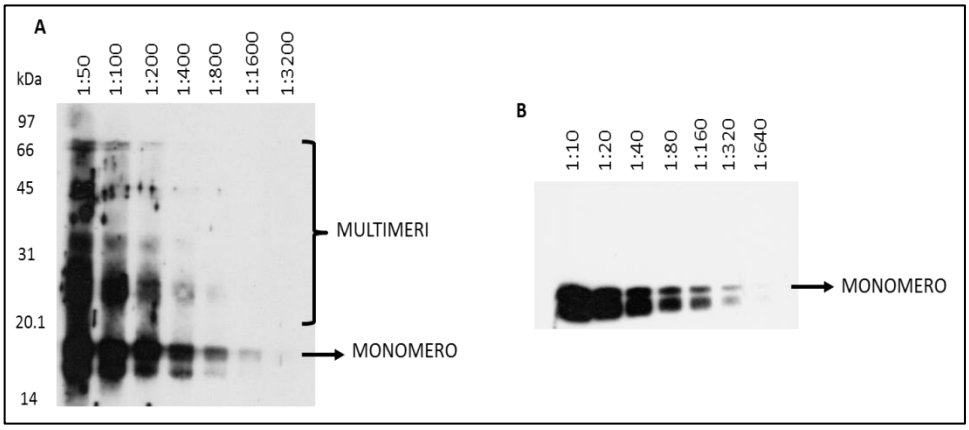
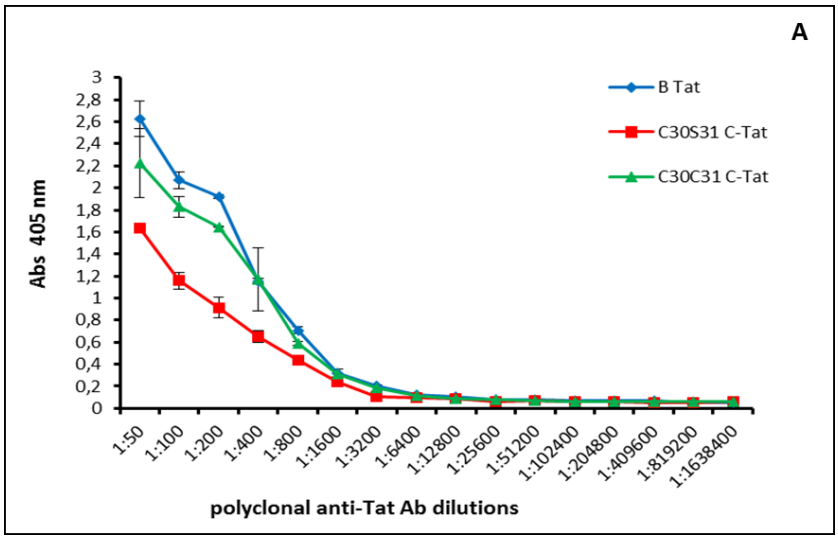


Figure 20. Immunoreattività in Western Immunoblotting della proteina Tat clade B: (A) Anticorpo policlonale anti-Tat; (B) Anticorpo monoclonale anti-Tat. Sono stati risolti su gel di poliacrilammide e trasferiti su membrana di nitrocellulosa 20 µg di proteina, tale da avere una distribuzione di 1.25 µg/lane di antigene.



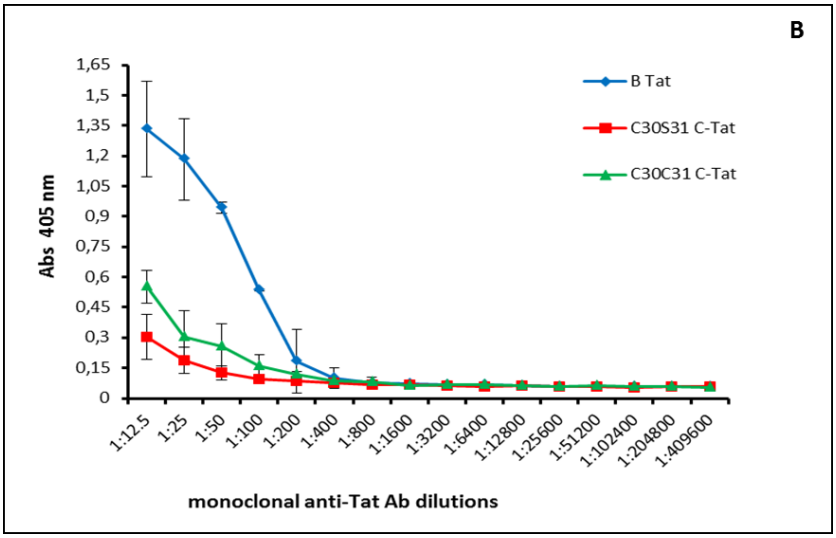


Figura 21. Valutazione in ELISA delle tre varianti della proteina Tat: (A) Anticorpo policlonale anti-Tat; (B) Anticorpo monoclonale anti-Tat. Sono riportati in grafico i valori di Abs ottenuti dopo 45 minuti dal trattamento dei campioni con il substrato cromogenico, come descritto nella sezione Materiali e metodi. Per ciascuna diluizione è indicato il valore medio di assorbanza ± SD.

3.2 Ottimizzazione del test ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-Tat verso le tre varianti della proteina virale

3.2.1 Valutazione delle performance del controllo positivo

Come riportato nel paragrafo 2.6.2, la messa a punto del test ELISA per la valutazione della risposta IgG specifica rispetto alle tre varianti Tat prese in considerazione ha richiesto l'inserimento di un controllo positivo necessario per verificare la funzionalità del saggio immunoenzimatico stesso.

Precedenti esperimenti di cross-linkage a diversi ratio pAb anti-Tat/HIgG hanno permesso di definire il ratio ottimale pari ad 1:0.03 (w/w) per la preparazione del pool di molecole ibride (dati non mostrati).

Di tale controllo positivo sono state prodotte tre diverse preparazioni utilizzando tre diversi lotti di anticorpo policlonale anti-Tat, presentanti differente concentrazione proteica (I lotto 2.24 mg/ml; II lotto 1.79 mg/ml; III lotto 2.27 mg/ml); di seguito è mostrato il profilo di titolazione (fig.22).

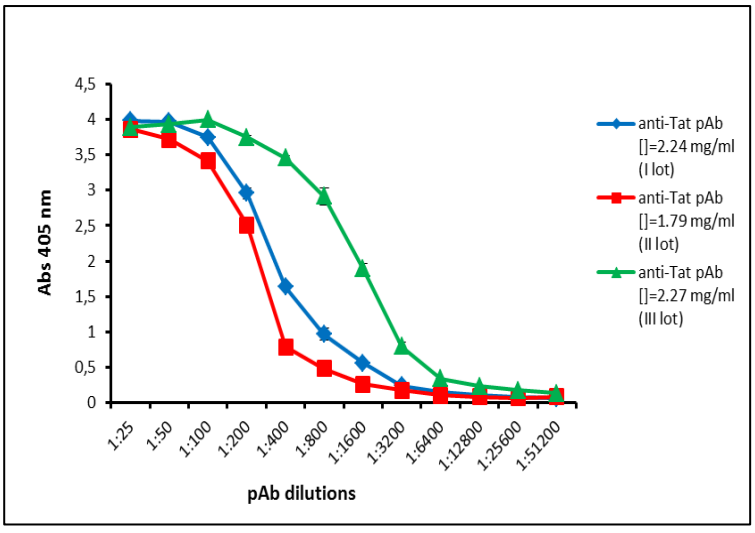


Figura 22. Profilo di titolazione, rispetto all'antigene Tat clade B, dei tre lotti di pAb impiegati per la produzione del CTR+.
Il saggio ELISA è stato allestito secondo le stesse modalità operative descritte nel paragrafo 2.5 della sezione Materiali e metodi. Sono state eseguite 12 diluizione seriali del pAb da 1:25 (v/v) a 1:51200 (v/v), come indicato in figura.

L’analisi della funzionalità dei tre lotti del controllo positivo ha messo in evidenza una buona riproducibilità di produzione e performance (fig.23), nonché stabilità delle molecole prodotte; le valutazioni sono state effettuate rispetto alle tre varianti di Tat. La stabilità è stata valutata fino a 90 giorni dal congelamento a -80°C delle preparazioni (fig.24, 25 e 26).

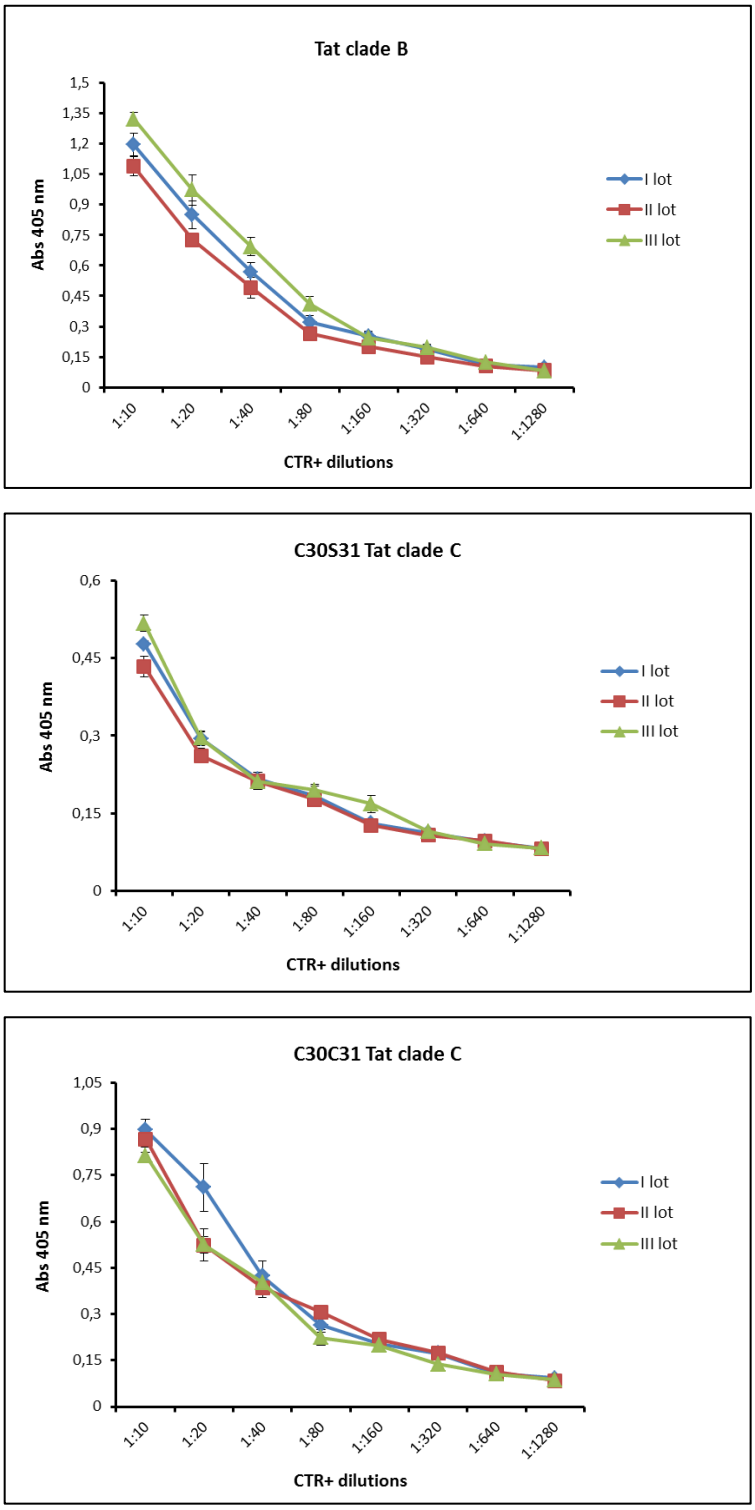


Figura 23. Analisi delle performance delle tre produzioni del controllo positivo rispetto ai tre antigeni Tat. Sono stati riportati in grafico i valori di assorbanza a 405 nm ottenuti dai test ELISA eseguiti dopo un giorno dalla produzione di ciascun lotto. Per ciascuna diluizione è indicato il valore medio di assorbanza ± SD.

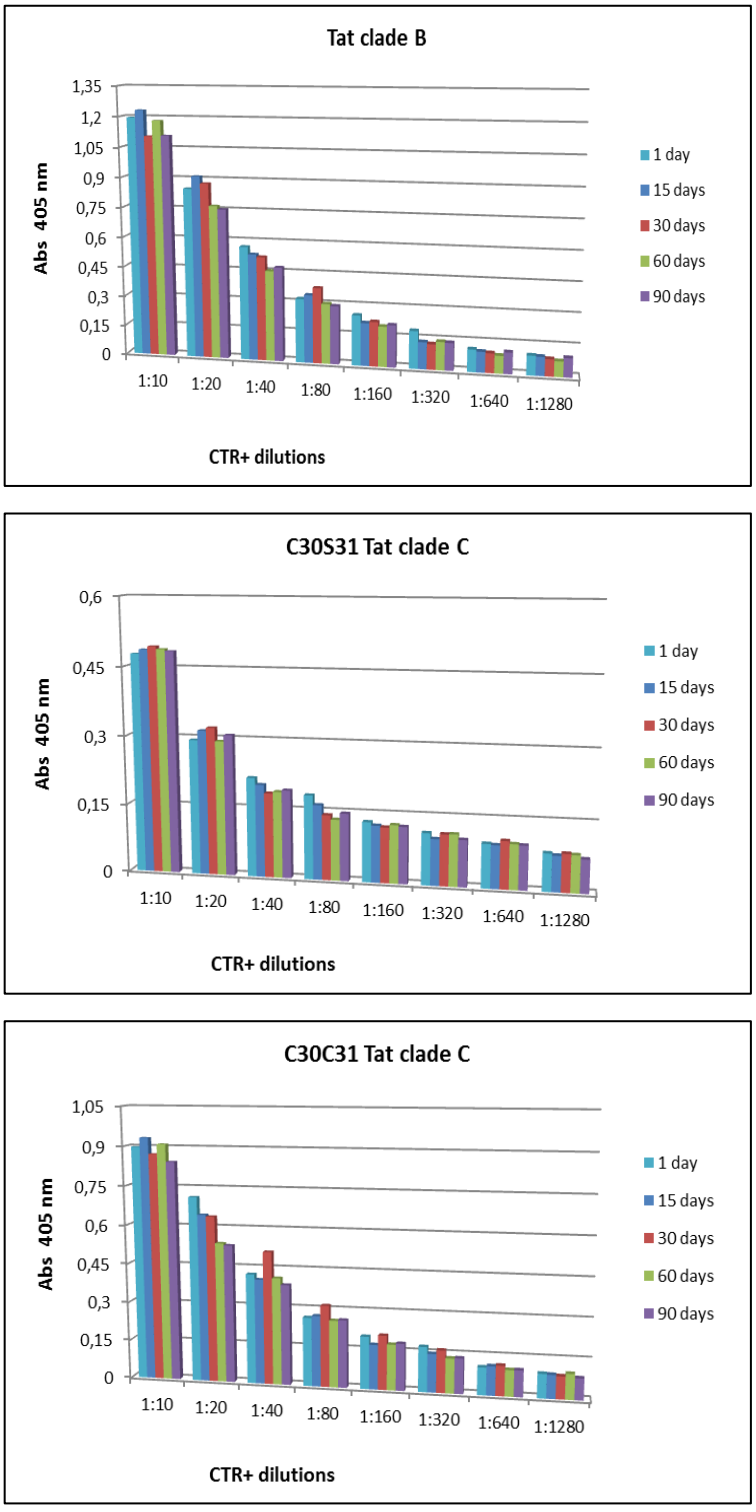


Figura 24. Valutazione della stabilità del controllo positivo I lotto. Sono riportati in grafico i livelli di reattività, valutata in termini di assorbanza a 405 nm, del CTR+ I lotto dopo 1, 15, 30, 60 e 90 giorni post produzione, rispetto a ciascun antigene Tat.

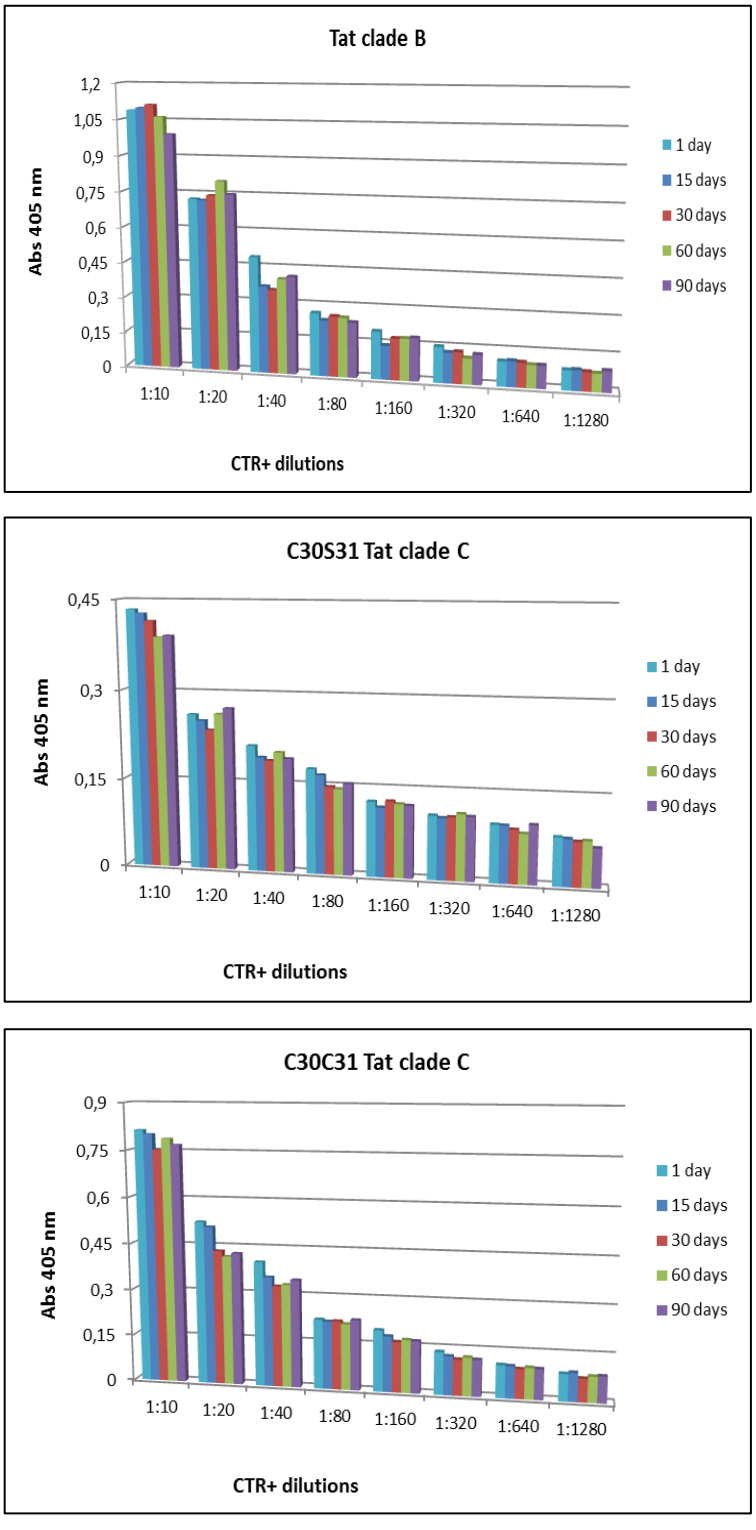


Figura 25. Valutazione della stabilità del controllo positivo II lotto. Sono riportati in grafico i livelli di reattività, valutata in termini di assorbanza a 405 nm, del CTR+ II lotto dopo 1, 15, 30, 60 e 90 giorni post produzione, rispetto a ciascun antigene Tat.

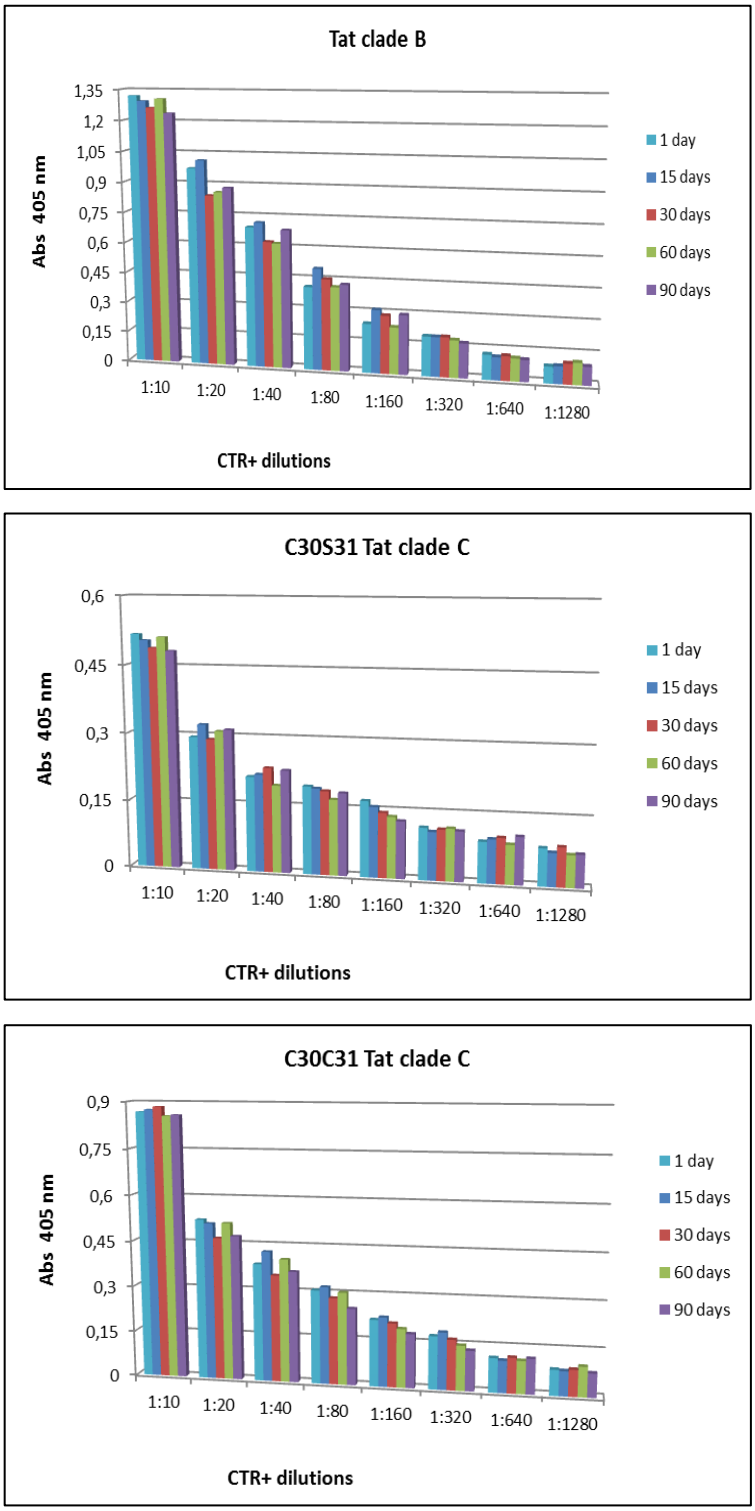


Figura 26. Valutazione della stabilità del controllo positivo III lotto. Sono riportati in grafico i livelli di reattività, valutata in termini di assorbanza a 405 nm, del CTR+ III lotto dopo 1, 15, 30, 60 e 90 giorni post produzione, rispetto a ciascun antigene Tat.

Come è ben osservabile a livello dei grafici (fig.23, 24, 25 e 26), il controllo positivo presenta una reattività più bassa verso l'antigene C30S31 Tat clade C, ciò ha portato alla decisione di utilizzare il CTR+ alla diluizione 1:10 (v/v) al fine di poter registrare un segnale ottimale di assorbanza a 405 nm per ciascuna variante Tat.

Dall'elaborazione dei dati relativi alle tre produzioni del controllo positivo alla diluizione 1:10 (v/v) rispetto ai tre antigeni, è stato possibile definire i valori di riferimento del CTR+ per le tre proteine Tat, di cui in tabella 1.

B Tat		C30S31 C-Tat		C30C31 C-Tat	
Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
1.17	0.12	0.44	0.07	0.81	0.08
Min	**Max**	**Min**	**Max**	**Min**	**Max**
1.06	1.3	**0.37**	0.516	**0.73**	0.9

Tabella 1. Valori di riferimento del controllo positivo 1:10 (v/v) rispetto alle tre varianti della proteina Tat. Sono riportati i valori medi (Mean) di assorbanza a 405 nm e di deviazione standard (SD) risultanti di 10 saggi ELISA eseguiti per ciascuna produzione del CTR+. In rosso è evidenziato il valore minimo di assorbanza (valore di riferimento) che il controllo positivo deve raggiungere perché il saggio sia valido.

3.2.2 Determinazione dei valori di cut-off

La fase di ottimizzazione dei tre test ELISA ha previsto la determinazione del valore di ***cut-off*** relativo a ciascun antigene Tat.

Il cut-off è il valore che permette di discriminare i campioni con immunoglobuline anti-Tat evidenziabili (definiti "detectable") da quelli presentanti livelli di immunoglobuline molto bassi da non essere rilevate (definiti "undetectable").

Per l'assegnazione dei cut-off sono stati utilizzati 77 campioni di plasma di donatori HIV-1 negativi.

Sono stati testati, verso ciascuna variante Tat, in tre saggi ELISA indipendenti e in triplicato, al fine di poter definire per ciascun campione il valore percentuale del coefficiente di variazione (%CV). Considerando la scelta di assumere il %CV <20% come parametro di valutazione di precisione, i campioni con %CV >20% sono stati definiti come "non accettabili" e quindi esclusi dal calcolo del cut-off.

Relativamente all'antigene Tat clade B, di cui in tabella 2 sono riportati i risultati dei tre saggi ELISA, sono stati esclusi dall'analisi 15 campioni con %CV superiore al 20% tale da calcolare il valore di cut-off su 62 campioni, pari a 0.300 Abs a 405 nm (tab.3).

Per quanto riguarda gli antigeni C30S31 C-Tat e C30C31 C-Tat (tab.4 e 6), sono stati eliminati 12 campioni con %CV >20% considerando così una coorte di 65 campioni e definendo un cut-off pari a 0.283 e 0.295 Abs a 405 nm, rispettivamente (tab.5 e 7).

SAMPLE	R1	R2	R3	MEAN	SD	CV	%CV <20%
M1	0,263666667	0,31943333	0,4135333	0,332211111	0,075746	0,228005651	22,80056513
M2	0,2294	0,21974	0,217	0,22046667	0,0065139	0,029335601	2,933560082
M3	0,266206667	0,19966667	0,2063333	0,224068889	0,0366443	0,163540368	16,3540368
M4	0,229	0,209	0,1906667	0,209555556	0,0191727	0,091492227	9,149222655
M5	0,225666667	0,24866667	0,2156667	0,23	0,0169214	0,073571247	7,357124723
M6	0,225266667	0,20611	0,2073333	0,212903333	0,0107244	0,050372242	5,037224158
M7	0,273906667	0,22306333	0,2187667	0,238578889	0,0306701	0,128553232	12,85532317
M8	0,1969	0,17136667	0,1613667	0,176544444	0,0183238	0,103791403	10,37914025
M9	0,2860393	0,21978	0,2203333	0,242050878	0,0380961	0,157388794	15,73887941
M10	0,187133333	0,18633333	0,205	0,192822222	0,0105538	0,054733566	5,473356594
M11	0,165666667	0,16707667	0,1737433	0,168828889	0,004314	0,025552672	2,555267201
M12	0,233666667	0,236063	0,2393963	0,236375333	0,0028776	0,012173751	1,217375055
M13	0,184	0,19998333	0,1999833	0,194655556	0,009228	0,047406722	4,740672197
M14	0,206333333	0,21166667	0,1923333	0,203444444	0,0099852	0,049080594	4,908059408
M15	0,181333333	0,18733333	0,1693333	0,179333333	0,0091652	0,051106792	5,110679214
M16	0,24816	0,44592277	0,4117471	0,368609968	0,1057031	0,286761298	28,67612978
M17	0,541970973	0,26872293	0,4308257	0,413839858	0,1374136	0,332045468	33,20454685
M18	0,179176667	0,21342221	0,2143627	0,202320537	0,0200487	0,099093724	9,909372362
M19	0,208366667	0,195	0,1901367	0,197834444	0,0094397	0,047715375	4,771537537
M20	0,2561	0,234	0,2154133	0,235171111	0,0203686	0,086611826	8,661182572
M21	0,176056667	0,145	0,1416667	0,154241111	0,0189662	0,122964603	12,29646026
M22	0,230063333	0,18873	0,18202	0,200271111	0,026018	0,129914094	12,99140941
M23	0,291170667	0,3015535	0,5116367	0,368120278	0,1243972	0,337925453	33,79254525
M24	0,198866667	0,20066667	0,1963333	0,198622222	0,002177	0,010960425	1,096042506
M25	0,180666667	0,18876667	0,1676667	0,179033333	0,0106444	0,059454872	5,945487163
M26	0,179866667	0,1701	0,1733333	0,174433333	0,0049754	0,028523125	2,852312545
F1	0,221203333	0,21075926	0,2168167	0,216259753	0,0052443	0,024249831	2,424983095
F2	0,201776667	0,18266667	0,1886667	0,191036667	0,009773	0,051157496	5,11574964
F3	0,398643333	0,47316333	0,6054567	0,492421111	0,1047429	0,212710109	21,27101091
F4	0,237643333	0,205	0,214	0,218881111	0,0168602	0,077028949	7,702894925
F5	0,219566667	0,22433333	0,2246667	0,222855556	0,0028531	0,012802613	1,280261299
F6	0,190333333	0,18733333	0,202	0,193222222	0,0077484	0,040100755	4,010075531
F7	0,34312	0,22078667	0,4852493	0,349718667	0,1323548	0,378460666	37,84606655
F8	0,2403	0,232	0,2343	0,235533333	0,0042852	0,018193798	1,81937985
F9	0,214303333	0,20223333	0,20992	0,208818889	0,0061099	0,029259201	2,925920135
F10	0,211333333	0,315	0,3699333	0,298755556	0,0805382	0,269578916	26,95789163
F11	0,184333333	0,17933333	0,1883333	0,184	0,0045092	0,024506792	2,450679213
F12	0,3118	0,234	0,2373333	0,261044444	0,0439872	0,168504588	16,85045885
F13	0,247027767	0,2066	0,2066	0,220075922	0,023341	0,106058772	10,60587716
F14	0,325466667	0,58759333	0,26985	0,394303333	0,1696882	0,43034929	43,03492899
F15	0,26642	0,21132556	0,2375367	0,238427407	0,027558	0,115582437	11,55824375
F16	0,133	0,14122333	0,1412233	0,138482222	0,0047477	0,034284139	3,42841387
F17	0,3060989	0,2140924	0,2367333	0,252308211	0,0479399	0,190005212	19,00052118
F18	0,457186667	0,20666667	0,2834667	0,315773333	0,1283466	0,406451778	40,64517778
F19	0,260098889	0,20943556	0,2157033	0,228412593	0,0276195	0,12091938	12,09193801
F20	0,219715667	0,18653333	0,1865333	0,197594111	0,0191578	0,096955466	9,69554658
F21	0,125	0,135	0,1293333	0,129777778	0,0050148	0,038641384	3,864138389
F22	0,272847367	0,225031	0,2034111	0,233763159	0,0355322	0,152000801	15,20008013
F23	0,311222199	0,25092333	0,2606033	0,274249622	0,0323829	0,118078305	11,80783051
G1	0,183733333	0,16133333	0,1766667	0,173911111	0,0114514	0,065846345	6,584634511
G2	0,2229	0,21166667	0,2203333	0,2183	0,0058862	0,026963978	2,696397755
G3	0,248455556	0,215	0,2133333	0,225596296	0,0198142	0,087830479	8,783047948
G4	0,26711	0,22396647	0,2195365	0,236870978	0,0262813	0,11095183	11,09518302
G5	0,148333333	0,146	0,144	0,146111111	0,0021688	0,014843514	1,484351429
G6	0,391946667	0,24081667	0,33971	0,324157778	0,0767559	0,236785714	23,67857143
G7	0,145566667	0,14423333	0,141	0,1436	0,0023483	0,016352963	1,635296258
G8	0,229988891	0,20466778	0,2193243	0,217993667	0,0127129	0,058317726	5,831772587
G9	0,482766667	0,25176667	0,1961	0,310211111	0,1520074	0,490012853	49,0012853
G10	0,257764	0,23106667	0,2213667	0,236732444	0,0188485	0,079619565	7,961956539
G11	0,200222223	0,20466667	0,2133333	0,206074074	0,0066679	0,032356815	3,235681466
G12	0,165	0,15433333	0,154	0,157777778	0,0062568	0,03965608	3,965607951
G13	0,216196667	0,21726667	0,216	0,216487778	0,0006817	0,003148757	0,314875672
G14	0,525796667	0,29566667	0,33204	0,384501111	0,1237097	0,321740713	32,17407128
G15	0,2371013	0,20383333	0,2143333	0,218422656	0,0170068	0,077861896	7,786189618
G16	0,232333333	0,26325667	0,3673333	0,287641111	0,0707262	0,245883624	24,58836238
G17	0,2239	0,2055	0,2073333	0,212244444	0,0101355	0,047754109	4,775410907
G18	0,212066667	0,20943333	0,1988667	0,206788889	0,006986	0,033783461	3,378346064
G19	0,204666667	0,202	0,206	0,204222222	0,0020367	0,009972961	0,997296125
G20	0,216033333	0,208	0,2063333	0,210122222	0,0051866	0,024683523	2,468352296
G21	0,241333333	0,24446667	0,2444667	0,243422222	0,001809	0,007431659	0,743165857
G22	0,207804667	0,16890667	0,1755733	0,184094889	0,0208021	0,112996478	11,29964777
G23	0,316	0,25122	0,392	0,31974	0,0704645	0,220380556	22,03805561
G24	0,215722226	0,20772222	0,215	0,212814816	0,0044251	0,020793076	2,07930764
G25	0,163	0,15633333	0,164	0,161111111	0,0041678	0,025868965	2,58689646
G26	0,59318	0,31024667	0,388568	0,430664889	0,1460888	0,339216811	33,92168113
G27	0,263433333	0,21215556	0,2190407	0,23154321	0,0278314	0,120199562	12,01995617
G28	0,203493704	0,17933333	0,1793333	0,18738679	0,013949	0,074439593	7,443959277

Tabella 2. Risultati dei 77 campioni di controllo ottenuti dai tre saggi ELISA (antigene Tat clade B). Sono riportati in tabella, per ogni campione, il valore medio in Abs a 405 nm di tre pozzetti gemelli ottenuto in ciascuno dei tre saggi ELISA eseguiti in sedute distinte (R1, R2 e R3), la media dei tre replicati (MEAN), la deviazione standard (SD), il valore di CV, dato dal rapporto SD/MEAN, e di %CV. Sono evidenziati in giallo i valori di %CV >20%.

SAMPLES	62
MEAN	0.2130
SD	0.029
SD*3	0.0874
MIN	0.1257
MAX	0.3004
CUT-OFF	**≥0.300**

Tabella 3. Valori di riferimento impiegati per la determinazione del cut-off relativo all'antigene Tat clade B. Sono indicati in tabella il numero di campioni considerati per la determinazione del valore di cut-off, il valore medio di Abs dei 62 campioni al quale è stato aggiunto il valore di SD moltiplicato per un fattore 3 ai fini della determinazione del cut-off.

SAMPLE	R1	R2	R3	MEAN	SD	CV	%CV <20%
M1	0,184	0,191	0,1864	0,187133333	0,0035572	0,019008652	1,900865204
M2	0,233	0,227	0,2206667	0,226888889	0,0061674	0,027182545	2,718254473
M3	0,236866667	0,23826667	0,2615543	0,245562556	0,013867	0,056470193	5,647019325
M4	0,3566667	0,23718	0,415333	0,336393233	0,0907903	0,269893431	26,98934314
M5	0,24666667	0,38774	0,2313334	0,288580023	0,0862166	0,298761516	29,8761516
M6	0,198333333	0,19433333	0,182	0,191555556	0,0085136	0,044444577	4,444457716
M7	0,192	0,1967	0,201	0,196566667	0,0045015	0,022900532	2,290053199
M8	0,1983333	0,21466667	0,2096667	0,207555547	0,0083688	0,040320934	4,032093431
M9	0,183	0,177	0,1933333	0,184444444	0,0082619	0,044793522	4,479352155
M10	0,212	0,228	0,208	0,216	0,010583	0,048995395	4,899539465
M11	0,154666667	0,15466667	0,163	0,157444444	0,0048113	0,030558412	3,055841227
M12	0,185	0,193334	0,187221	0,188518333	0,0043158	0,022893304	2,28933039
M13	0,196667	0,18433333	0,191	0,190666778	0,0061736	0,032378907	3,237890711
M14	0,419333	0,338	0,2455111	0,334281367	0,0869706	0,26017183	26,01718305
M15	0,197	0,23433333	0,225	0,218777778	0,0194289	0,088806472	8,88064723
M16	0,1897	0,194667	0,205	0,196455667	0,0078053	0,03973036	3,973036023
M17	0,2633333	0,2593	0,2892667	0,270633322	0,0162625	0,06009043	6,00904303
M18	0,2166	0,195	0,1926667	0,201422222	0,013196	0,065514197	6,551419682
M19	0,19333	0,167	0,1866667	0,182332222	0,0136897	0,075081058	7,508105815
M20	0,213	0,194	0,211	0,206	0,0104403	0,0506811	5,068109956
M21	0,163333	0,13533333	0,144	0,147555444	0,0143344	0,09714614	9,71461397
M22	0,2149	0,19647	0,2256667	0,212345556	0,014765	0,069532889	6,95328894
M23	0,1693331	0,17833333	0,1746667	0,174111033	0,0045258	0,025993587	2,599358674
M24	0,19633333	0,2113333	0,178	0,19522221	0,0166944	0,085514887	8,551488655
M25	0,216	0,214445	0,202	0,210815	0,0076735	0,036399235	3,639923507
M26	0,18133	0,18	0,175	0,178776667	0,0033376	0,018669153	1,86691529
F1	0,224112	0,223	0,215337	0,220816333	0,0047777	0,021636552	2,163655203
F2	0,208221	0,19466667	0,2273333	0,210073667	0,0164119	0,078124731	7,812473071
F3	0,32631	0,4212334	0,2434	0,330314467	0,0889843	0,269392694	26,93926938
F4	0,227	0,213	0,2216667	0,220555557	0,0070658	0,032036501	3,203650097
F5	0,203666667	0,177	0,1833333	0,188	0,0139324	0,074108385	7,410838495
F6	0,188	0,2157	0,207	0,203566667	0,0141656	0,069586877	6,958687695
F7	0,389	0,232	0,3236667	0,314888889	0,0788672	0,250460446	25,04604456
F8	0,158333333	0,163	0,1553333	0,158888889	0,0038634	0,024315159	2,431515895
F9	0,196	0,175333	0,1826667	0,184666557	0,0104776	0,056738142	5,673814163
F10	0,276667	0,42533333	0,3093333	0,337111221	0,0781289	0,231760061	23,17600612
F11	0,184333333	0,18366667	0,1763333	0,181444444	0,0044389	0,024464157	2,44641572
F12	0,19337	0,195	0,1756667	0,188012222	0,0107226	0,057031307	5,703130708
F13	0,223	0,19666667	0,187	0,202222222	0,0186319	0,092135829	9,213582902
F14	0,191	0,195333	0,178	0,188111	0,0090204	0,047952641	4,795264086
F15	0,173	0,179	0,181	0,177666667	0,0041633	0,023433388	2,343338836
F16	0,210666667	0,227	0,2346667	0,224111111	0,012258	0,05469621	5,469620983
F17	0,244333333	0,24566667	0,2533333	0,247777778	0,0048572	0,019603133	1,960313273
F18	0,1691114	0,152	0,1533333	0,158148244	0,0095177	0,060182446	6,01824456
F19	0,154	0,185	0,157	0,165333333	0,0170978	0,10341386	10,34138597
F20	0,187	0,17633333	0,207	0,190111111	0,0155682	0,081890262	8,189026248
F21	0,213333333	0,20666667	0,2256667	0,215222222	0,0096398	0,044790028	4,479002835
F22	0,219666667	0,21833333	0,2086667	0,215555556	0,0060031	0,027849366	2,784936631
F23	0,216334	0,227	0,1936667	0,212333556	0,0170229	0,080170742	8,017074236
G1	0,171	0,16266667	0,183	0,172222222	0,0102216	0,059351332	5,935133229
G2	0,143	0,157	0,137177	0,145725667	0,0101887	0,069917047	6,991704694
G3	0,217	0,213	0,221	0,217	0,004	0,01843318	1,843317972
G4	0,1558	0,168333	0,1601666	0,1614332	0,0063618	0,039408119	3,940811899
G5	0,1943337	0,202	0,185773	0,194035567	0,0081176	0,041835666	4,183566564
G6	0,215	0,197	0,188667	0,200222333	0,013459	0,067220202	6,722020209
G7	0,214667	0,2238	0,215	0,217822333	0,0051795	0,023778499	2,377849855
G8	0,18455	0,1972	0,20417	0,195306667	0,0099461	0,050925483	5,0925483
G9	0,321	0,3843331	0,227	0,3107777	0,0791631	0,254725831	25,4725831
G10	0,167	0,179	0,158	0,168	0,0105357	0,062712225	6,271222472
G11	0,1953333	0,211	0,198	0,201444433	0,0083821	0,041609945	4,160994505
G12	0,2287	0,240279	0,2637667	0,244248556	0,0178672	0,073151594	7,315159407
G13	0,2245	0,213	0,221	0,2195	0,0058949	0,026856096	2,685609595
G14	0,42333337	0,2124448	0,267555	0,301111057	0,1093755	0,363239793	36,32397934
G15	0,217333337	0,32577	0,3782222	0,307108526	0,0820518	0,267175257	26,71752566
G16	0,174337	0,183	0,175	0,177445667	0,0048216	0,027172279	2,717227858
G17	0,1553336	0,153	0,1754444	0,161259349	0,0123399	0,076522337	7,652233738
G18	0,216	0,19776	0,186667	0,200142333	0,0148109	0,074001852	7,400185181
G19	0,247	0,3974	0,3614447	0,335281567	0,0785393	0,234248796	23,42487959
G20	0,212667	0,38146667	0,2553333	0,283155667	0,0877718	0,3099773	30,99772998
G21	0,177	0,162	0,176	0,171666667	0,0083865	0,048853381	4,885338107
G22	0,157	0,173	0,171	0,167	0,0087178	0,052202383	5,220238256
G23	0,3864	0,213	0,247	0,282133333	0,0918839	0,325675492	32,56754924
G24	0,157	0,15933333	0,1646667	0,160333333	0,0039299	0,024511073	2,451107302
G25	0,196666667	0,218	0,213	0,209222222	0,0111571	0,053326682	5,332668212
G26	0,22486667	0,22078	0,236389	0,227345223	0,0080943	0,035603549	3,560354888
G27	0,194666667	0,20166667	0,2043333	0,200222222	0,0049926	0,02493523	2,493522968
G28	0,153331	0,165	0,171	0,163110333	0,0089848	0,055084149	5,50841486

Tabella 4. Risultati dei 77 campioni di controllo ottenuti dai tre saggi ELISA (antigene C30S31 Tat clade C). Sono riportati in tabella, per ogni campione, il valore medio in Abs a 405 nm di tre pozzetti gemelli ottenuto in ciascuno dei tre saggi ELISA eseguiti in sedute distinte (R1, R2 e R3), la media dei tre replicati (MEAN), la deviazione standard (SD), il valore di CV, dato dal rapporto SD/MEAN, e di %CV. Sono evidenziati in giallo i valori di %CV >20%.

SAMPLES	65
MEAN	0.1956
SD	0.029
SD*3	0.0872
MIN	0.1084
MAX	0.2828
CUT-OFF	**≥0.283**

Tabella 5. Valori di riferimento impiegati per la determinazione del cut-off relativo all'antigene C30S31 Tat clade C. Sono indicati in tabella il numero di campioni considerati per la determinazione del valore di cut-off, il valore medio di Abs dei 65 campioni al quale è stato aggiunto il valore di SD moltiplicato per un fattore 3 ai fini della determinazione del cut-off.

SAMPLE	R1	R2	R3	MEAN	SD	CV	%CV <20%
M1	0,164	0,169	0,1756667	0,169555556	0,0058531	0,034520491	3,452049067
M2	0,224	0,22566667	0,235	0,228222222	0,0059286	0,025977257	2,59772572
M3	0,152	0,15366667	0,1536667	0,153111111	0,0009623	0,006284655	0,62846546
M4	0,378333333	0,265	0,4496667	0,364333333	0,093126	0,255606478	25,56064779
M5	0,306	0,45666667	0,2266667	0,329777778	0,1168291	0,354266118	35,42661184
M6	0,195	0,1873333	0,178	0,186777767	0,0085136	0,045581467	4,558146686
M7	0,188	0,208	0,187	0,194333333	0,0118462	0,060958338	6,09583384
M8	0,239	0,23466667	0,2366667	0,236777778	0,0021688	0,009159653	0,915965335
M9	0,173666667	0,17366667	0,1683333	0,171888889	0,0030792	0,017913906	1,791390622
M10	0,23	0,22633333	0,21	0,222111111	0,0106476	0,047937954	4,793795441
M11	0,281	0,26933333	0,2556667	0,268666667	0,0126798	0,047195351	4,719535137
M12	0,223	0,24266667	0,235	0,233555556	0,0099126	0,042442068	4,244206837
M13	0,184	0,18633333	0,1816667	0,184	0,0023333	0,012681159	1,268115942
M14	0,279333333	0,358	0,4323333	0,356555556	0,0765102	0,214581503	21,45815026
M15	0,239	0,24466667	0,245	0,242888889	0,003372	0,013882883	1,38828828
M16	0,173	0,17333333	0,175	0,173777778	0,0010715	0,006166017	0,616601711
M17	0,134333333	0,13433333	0,156	0,141555556	0,0125093	0,088369939	8,836993916
M18	0,166333333	0,16633333	0,1626667	0,165111111	0,002117	0,012821372	1,282137206
M19	0,234	0,2636	0,2616667	0,253088889	0,0165597	0,065430376	6,543037614
M20	0,191	0,198	0,2016667	0,196888889	0,0054194	0,027525391	2,752539142
M21	0,208	0,22666667	0,241	0,225222222	0,0165474	0,073471217	7,347121667
M22	0,224666667	0,22433333	0,2156667	0,221555556	0,0051027	0,023031018	2,303101806
M23	0,174	0,18033333	0,173	0,175777778	0,0039768	0,022623932	2,262393194
M24	0,146333333	0,14866667	0,1473333	0,147444444	0,0011706	0,007939453	0,793945272
M25	0,224	0,22	0,2046667	0,216222222	0,0102053	0,047198201	4,719820145
M26	0,186333333	0,18633333	0,1786667	0,183777778	0,0044264	0,02408535	2,40853498
F1	0,223333333	0,206	0,2246667	0,218	0,0104137	0,047769111	4,776911117
F2	0,176666667	0,197	0,1853333	0,186333333	0,0102035	0,054759313	5,475931258
F3	0,256333333	0,40933333	0,4253333	0,363666667	0,093297	0,256545417	25,65454173
F4	0,205	0,21666667	0,1963333	0,206	0,0102035	0,049531482	4,953148176
F5	0,173	0,173	0,1643333	0,170111111	0,0050037	0,029414318	2,941431809
F6	0,158666667	0,15766667	0,164	0,160111111	0,0034048	0,021265168	2,126516786
F7	0,229	0,211	0,357	0,265666667	0,0796074	0,299651329	29,96513294
F8	0,220666667	0,22533333	0,2183333	0,221444444	0,0035642	0,016095349	1,609534865
F9	0,176	0,17166667	0,1716667	0,173111111	0,0025019	0,014452285	1,44522853
F10	0,283666667	0,42733333	0,312	0,340999999	0,0760972	0,223158823	22,31588225
F11	0,218333333	0,207	0,216	0,213777778	0,0059845	0,027994247	2,799424736
F12	0,176333333	0,174	0,181	0,177111111	0,0035642	0,020124235	2,012423454
F13	0,20266667	0,183	0,1913333	0,192333323	0,0098714	0,051324433	5,132443263
F14	0,150666667	0,14633333	0,1463333	0,147777778	0,0025019	0,01692982	1,692981992
F15	0,124666667	0,13233333	0,1476667	0,134888889	0,011711	0,086819803	8,681980312
F16	0,237333333	0,214	0,2193333	0,223555556	0,0122263	0,054690039	5,469003858
F17	0,225	0,219	0,2313333	0,225111111	0,0061674	0,027397214	2,739721439
F18	0,221333333	0,21833333	0,226	0,221888889	0,0038634	0,017411456	1,741145583
F19	0,222666667	0,216	0,2136667	0,217444444	0,0046706	0,021479662	2,14796623
F20	0,245	0,23533333	0,2446667	0,241666667	0,0054874	0,022706314	2,270631398
F21	0,200333333	0,20666667	0,2043333	0,203777778	0,003203	0,015718141	1,571814101
F22	0,219666667	0,21833333	0,2086667	0,215555556	0,0060031	0,027849366	2,784936631
F23	0,268333333	0,266	0,295	0,276444444	0,0161119	0,058282515	5,828251463
G1	0,174666667	0,20466667	0,1646667	0,181333333	0,0208167	0,114797757	11,47977573
G2	0,232666667	0,22666667	0,2256667	0,228333333	0,0037859	0,016580754	1,658075429
G3	0,198666667	0,19233333	0,189	0,193333333	0,0049103	0,025398138	2,539813769
G4	0,135333333	0,14433333	0,1443333	0,141333333	0,0051962	0,036765229	3,676522941
G5	0,177	0,182	0,1836667	0,180888889	0,0034694	0,019179969	1,917996928
G6	0,163	0,16766667	0,1656667	0,165444444	0,0023413	0,014151315	1,415131464
G7	0,240333333	0,23833333	0,2353333	0,238	0,0025166	0,010573998	1,057399781
G8	0,202	0,17933333	0,2133333	0,198222222	0,017312	0,087336084	8,733608387
G9	0,368	0,39533333	0,221	0,328111111	0,0937623	0,285763891	28,57638911
G10	0,214	0,15833333	0,167	0,179777778	0,0299524	0,166608086	16,66080858
G11	0,211666667	0,19366667	0,192	0,199111111	0,0109053	0,054770004	5,477000427
G12	0,155666667	0,17433333	0,184	0,171333333	0,0144029	0,084063804	8,406380428
G13	0,213666667	0,202	0,1993333	0,205	0,0076231	0,03718568	3,718568008
G14	0,349333333	0,20233333	0,2496667	0,267111111	0,0750365	0,280918806	28,09188057
G15	0,199666667	0,38566667	0,2716667	0,285666667	0,093787	0,328309193	32,83091927
G16	0,187333333	0,19166667	0,207	0,195333333	0,0103333	0,052901024	5,290102389
G17	0,15	0,15566667	0,1623333	0,156	0,0061734	0,039573203	3,957320337
G18	0,176	0,173	0,1743333	0,174444444	0,0015031	0,008616401	0,86164008
G19	0,252666667	0,404	0,3533333	0,336666667	0,077031	0,228805005	22,88050048
G20	0,219333333	0,37666667	0,2743333	0,290111111	0,0798445	0,275220499	27,52204993
G21	0,185333333	0,16866667	0,166	0,173333333	0,0104775	0,060447052	6,044705248
G22	0,165	0,17133333	0,1693333	0,168555556	0,0032375	0,019207386	1,9207386
G23	0,348666667	0,208	0,2396667	0,265444444	0,0737912	0,277991303	27,79913034
G24	0,217	0,23566667	0,2426667	0,231777778	0,0132679	0,057244034	5,724403392
G25	0,172666667	0,169	0,163	0,168222222	0,00488	0,0290095	2,900949968
G26	0,237	0,244	0,2446667	0,241888889	0,004247	0,017557662	1,755766179
G27	0,245	0,236	0,2433333	0,241444444	0,0047881	0,019831074	1,983107356
G28	0,172	0,178	0,167	0,172333333	0,0055076	0,031958823	3,195882329

Tabella 6. Risultati dei 77 campioni di controllo ottenuti dai tre saggi ELISA (antigene C30C31 Tat clade C). Sono riportati in tabella, per ogni campione, il valore medio in Abs a 405 nm di tre pozzetti gemelli ottenuto in ciascuno dei tre saggi ELISA eseguiti in sedute distinte (R1, R2 e R3), la media dei tre replicati (MEAN), la deviazione standard (SD), il valore di CV, dato dal rapporto SD/MEAN, e di %CV. Sono evidenziati in giallo i valori di %CV >20%.

SAMPLES	65
MEAN	0.1973
SD	0.033
SD*3	0.0976
MIN	0.0997
MAX	0.2949
CUT-OFF	**≥0.295**

Tabella 7. Valori di riferimento impiegati per la determinazione del cut-off relativo all'antigene C30C31 Tat clade C. Sono indicati in tabella il numero di campioni considerati per la determinazione del valore di cut-off, il valore medio di Abs dei 65 campioni al quale è stato aggiunto il valore di SD moltiplicato per un fattore 3 ai fini della determinazione del cut-off.

3.2.3 Definizione dei valori di accettabilità degli standard relativamente ai tre saggi ELISA

Per ogni test ELISA per la valutazione della risposta IgG anti B-Tat, C30S31 C-Tat e C30C31 C-Tat, dalle valutazioni fatte sulla funzionalità del controllo positivo e prendendo in esame i valori di Abs a 405 nm relativi al controllo negativo e background, riportati nelle tabelle 8, 9 e 10 e ottenuti dall'esecuzione dei saggi ELISA sui campioni di controllo, sono stati stabiliti i valori di assorbanza in cui devono ricadere gli standard di riferimento affinché i saggi siano considerati validi.
I valori di riferimento degli standard sono riportati nelle tabelle 11, 12 e 13.

	R1	R2	R3	MEAN	SD
CTR -	0.1365	0.1277	0.1395	0.1346	0.006
BACKGROUND	0.085	0.075	0.078	0.079	0.005

Tabella 8. Valori di assorbanza relativi al controllo negativo e al background (antigene Tat clade B). Riferiti al CTR- e al background, sono riportati il valore medio di Abs a 405 nm dei tre replicati (R1, R2 e R3), la media dei tre replicati (MEAN) e il valore di deviazione standard (SD).

	R1	R2	R3	MEAN	SD
CTR -	0.1344	0.1384	0.1441	0.139	0.005
BACKGROUND	0.066	0.065	0.058	0.063	0.004

Tabella 9. Valori di assorbanza relativi al controllo negativo e al background (antigene C30S31 Tat clade C). Riferiti al CTR- e al background, sono riportati il valore medio di Abs a 405 nm dei tre replicati (R1, R2 e R3), la media dei tre replicati (MEAN) e il valore di deviazione standard (SD).

	R1	R2	R3	MEAN	SD
CTR -	0.141	0.1454	0.144	0.143	0.002
BACKGROUND	0.072	0.076	0.071	0.073	0.003

Tabella 10. Valori di assorbanza relativi al controllo negativo e al background (antigene C30C31 Tat clade C). Riferiti al CTR- e al background, sono riportati il valore medio di Abs a 405 nm dei tre replicati (R1, R2 e R3), la media dei tre replicati (MEAN) e il valore di deviazione standard (SD).

Background	CTR-	CTR+
≤0.120	≤0.150	≥1.06

Tabella 11. Criteri di accettabilità degli standard (antigene Tat clade B).

Background	CTR-	CTR+
≤0.120	≤0.150	≥0.370

Tabella 12. Criteri di accettabilità degli standard (antigene C30S31 Tat clade C).

Background	CTR-	CTR+
≤0.120	≤0.150	≥0.730

Tabella 13. Criteri di accettabilità degli standard (antigene C30C31 Tat clade C).

3.3 Valutazione della risposta IgG anti-Tat clade B e analisi dei livelli di infezione nella coorte di pazienti HIV-1 positivi Europei

La coorte di pazienti sieropositivi Europei (n=102) è stata oggetto di valutazione della risposta IgG anti B-Tat.

Sulla base del valore di cut-off definito per l'antigene Tat clade B, pari a 0.300, sono stati individuati 26 campioni (25.5%) presentanti alla diluizione 1:50 (v/v) un valore di Abs maggiore del cut-off, quindi con IgG anti B-Tat "detectable", a differenza di 76 campioni (74.5%) per i quali i valori risultano più bassi del cut-off di riferimento, quindi con una risposta IgG anti B-Tat "undetectable" (fig.27).

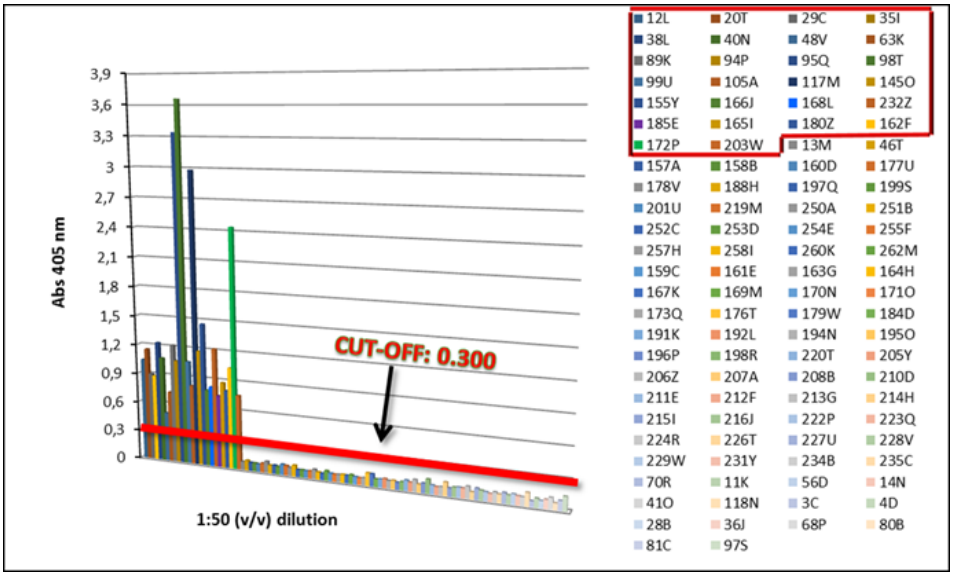


Figura 27. Valutazione della risposta IgG anti B-Tat dei soggetti sieropositivi Europei.
È riportato per ciascun campione il valore medio di Abs a 405 nm risultante di due saggi immunoenzimatici indipendenti, con valutazione in triplicato della diluizione 1:50 (v/v) del campione.
In grafico sono delineati in rosso i 26 campioni con IgG anti-Tat "detectable" (Abs 405 nm ≥0.300).

I soggetti dei due gruppi individuati, “detectable” e “undetectable”, sono stati sottoposti ad ulteriore analisi ponendo a confronto, tra i due gruppi, i livelli di infezione mediante comparazione dei marcatori di monitoraggio dell’infezione da HIV-1: carica virale (HIV RNA, copies/ml), conta di linfociti T CD4+ (CD4+, cells/µl), livelli di HIV DNA cellulare (cellular HIV DNA, copies/10^4 CD4).

Analizzando le caratteristiche cliniche della coorte dei 102 pazienti Europei (tab.14) e confrontando i livelli dei markers di infezione, è emerso che tra i 26 pazienti con IgG anti-Tat “detectable” e i 76 pazienti con IgG anti-Tat “undetectable” non vi sono differenze significative (fig.28).

Characteristics	**All subjects n=102**
Sex, n (%)	
M	75 (74%)
F	27 (26%)
Age, median years (IQR)[a]	51 (45-57)
Coinfection, n (%)[b]	46 (53.5%)
CDC classification, n (%)	
AIDS (A3, B3, C1-C3)	38 (37%)
no AIDS (A1, A2, B1, B2)	64 (63%)
CD4+ T cell count, median cells/µl (IQR)	619.5 (421-921.5)
HIV RNA load, median copies/ml (IQR)	49 (49-21579373)
Cellular HIV DNA load, median copies/10^4 CD4 (IQR)	8 (2-20.4)
Years from diagnosis, median years (IQR)[c]	8 (4-18)
ART, n (%)	90 (88%)
no ART, n (%)	12 (12%)
Years on ART, median years (IQR)[d]	8 (3-15.3)

Tabella 14. Caratteristiche cliniche della coorte di pazienti sieropositivi Europei. [a]Di 12 pazienti non si hanno informazioni. [b]Di 16 pazienti non si hanno informazioni. [c]Di 13 pazienti non si hanno informazioni. [d]Di 21 pazienti non si hanno informazioni.

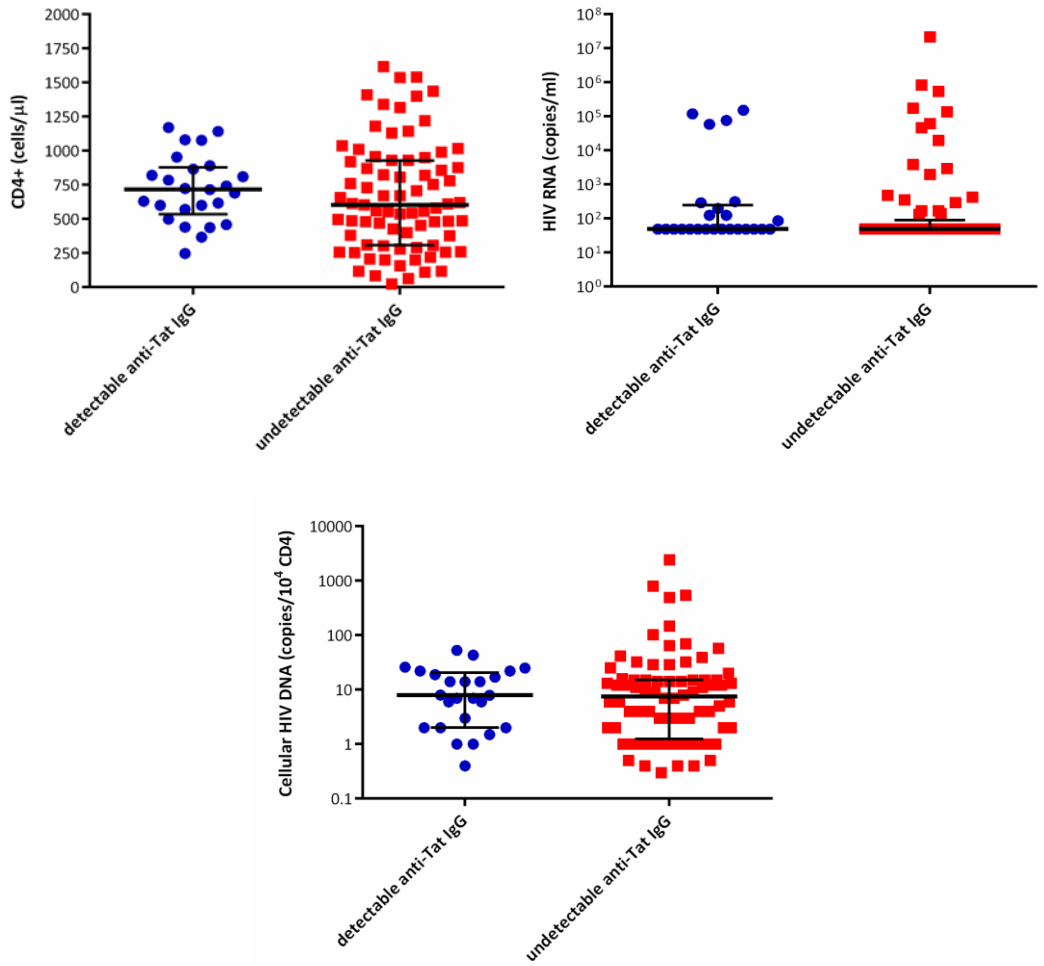


Figura 28. Analisi dei livelli di infezione a livello della coorte di 102 sieropositivi Europei.
Ai fini dell'analisi statistica i valori di carica virale <50 copies/ml sono stati indicati come 49 copies/ml; a livello di ciascuna distribuzione è indicata la mediana e le barre di errore rappresentano i valori di range interquartile (IQR). Per l'analisi di confronto è stato eseguito il Mann-Whitney test.

L'analisi è stata maggiormente approfondita; sono stati individuati subset di pazienti, secondo diversi criteri, a livello dei quali sono state eseguite le comparazioni tra i gruppi "detectable" vs "undetectable" circa i livelli dei marcatori sopra indicati.

Sono stati raggruppati e confrontati 10 soggetti con IgG anti B-Tat detectable e 19 sieropositivi undetectable con valori misurabili di carica virale (HIV RNA >50 copies/ml).

Dalle valutazioni fatte, è emerso che la conta linfocitaria T CD4+ è significativamente più elevata per i pazienti detectable rispetto ai sieropositivi undetectable (detectable mediana=612 cells/µl, IQR=466-739 cells/µl vs undetectable mediana=291 cells/µl, IQR=117-484 cells/µl; p=0.04). Al contempo, seppur non raggiunta la significatività statistica, è importante sottolineare livelli di viremia più bassi osservati per i soggetti con risposta anticorpale anti-Tat rispetto ai pazienti undetectable (fig.29), i quali presentano una mediana pari a 2960 copies/ml (IQR=291-135685 copies/ml) 10 volte maggiore rispetto alla mediana relativa al gruppo dei sieropositivi detectable [301 copies/ml (IQR=125-87091 copies/ml)]. I livelli di DNA virale, invece, evidenziano, anche se non con valori statisticamente significativi, un trend più basso di copie di HIV DNA nei soggetti detectable, con una mediana di 15 copies/10^4 CD4 (IQR=5-30 copies/10^4 CD4) pari a circa la metà del valore relativo al gruppo di pazienti undetectable [29 copies/10^4 CD4 (IQR=12-101 copies/10^4 CD4)] (fig.29).

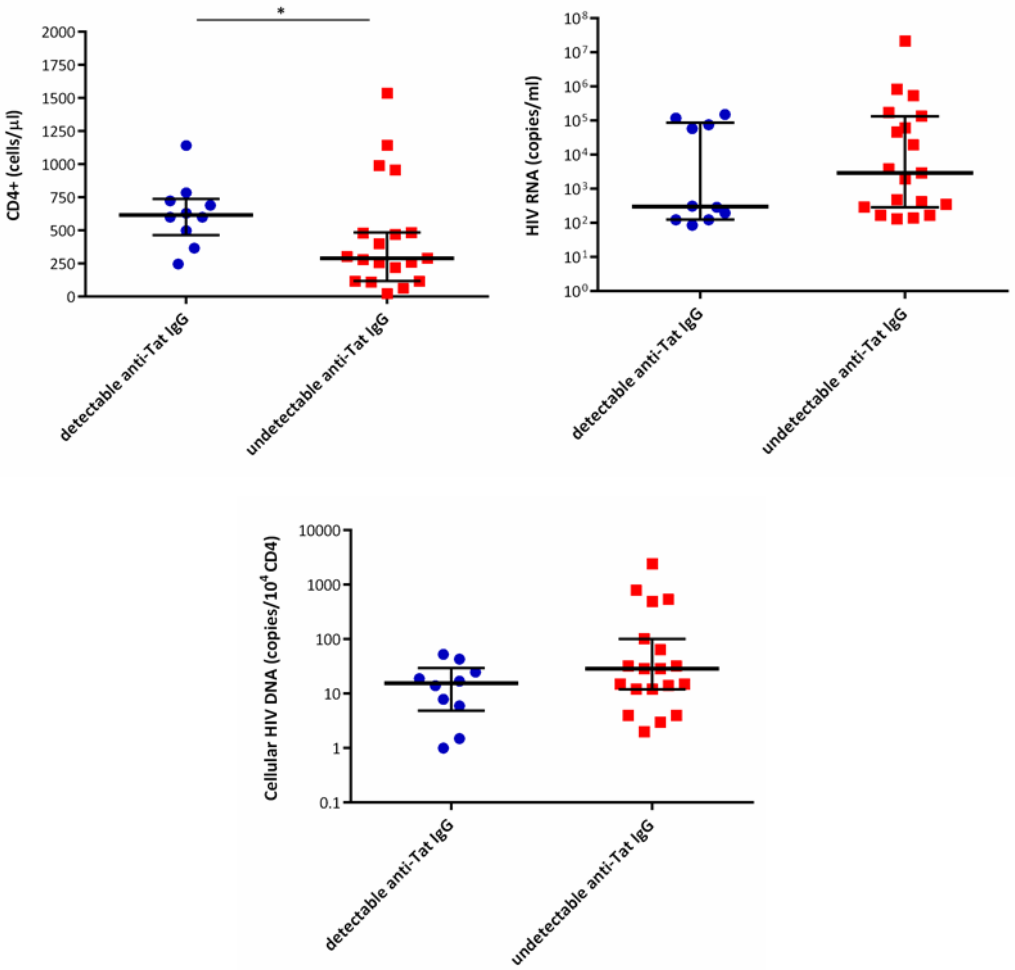


Figura 29. Sieropositivi con HIV RNA >50 copies/ml: analisi di confronto dei livelli dei marcatori di monitoraggio dell'infezione. A livello di ciascuna distribuzione è indicata la mediana e le barre di errore rappresentano i valori di range interquartile (IQR). Per l'analisi di confronto è stato eseguito il Mann-Whitney test; *p≤0.05.

Categorizzando per valori di HIV DNA cellulare ≥20 copies/10^4 CD4, sono stati individuati 7 soggetti HIV-1 positivi con IgG anti B-Tat detectable e 17 soggetti undetectable (fig.30). Anche in questo caso è stato evidenziato un numero significativamente più alto di cellule CD4+ in presenza della risposta anticorpale anti-Tat (detectable mediana=459 cells/µl, IQR=248-690 cells/ µl vs undetectable mediana=220 cells/µl, IQR=137-306 cells/ µl; p=0.04), accanto ad una stima delle cellule infettate, quindi ai livelli di HIV DNA cellulare, significativamente più bassa (detectable mediana=26 copies/10^4 CD4, IQR=22-43 copies/10^4 CD4 vs undetectable mediana=57 copies/10^4 CD4, IQR=30-321 copies/10^4 CD4; p=0.04) (fig.30).

Per quanto riguarda l'analisi dei livelli di replicazione virale, i pazienti detectable presentano una mediana più bassa rispetto ai sieropositivi undetectable (detectable mediana=49 copies/ml, IQR=49-58622 copies/ml vs undetectable mediana=1972 copies/ml, IQR=49-154579 copies/ml); valutazione degna di nota anche se non raggiunta la significatività statistica (fig.30).

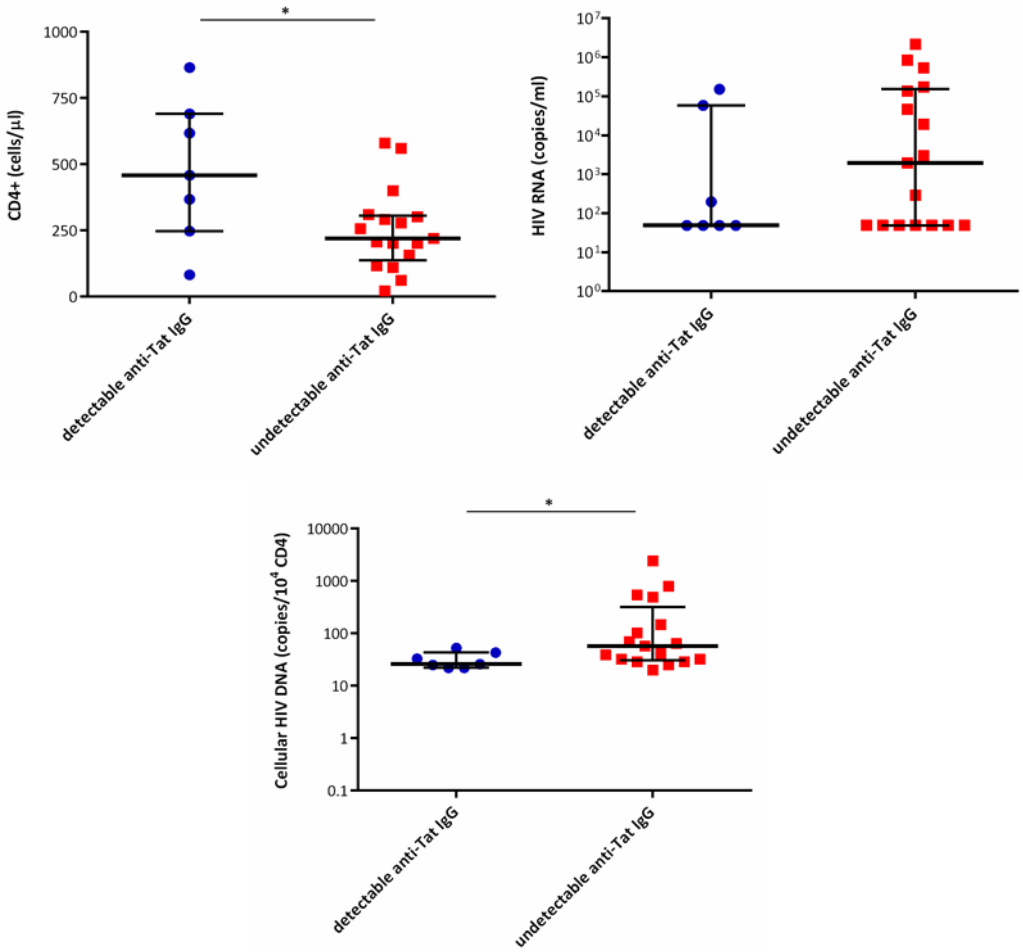


Figura 30. Sieropositivi con HIV DNA ≥20 copies/10^4CD4: analisi di confronto dei livelli dei marcatori di monitoraggio dell'infezione. Ai fini dell'analisi statistica i valori di carica virale <50 copies/ml sono stati indicati come 49 copies/ml; a livello di ciascuna distribuzione è indicata la mediana e le barre di errore rappresentano i valori di range interquartile (IQR). Per l'analisi di confronto è stato eseguito il Mann-Whitney test; *p≤0.05.

Sono stati, inoltre, individuati 12 sieropositivi non in terapia antiretrovirale (naïve), di cui 5 con risposta anticorpale anti-Tat detectable e 7 pazienti con IgG anti-Tat undetectable (fig.31). I sieropositivi detectable presentano livelli circolanti di linfociti T CD4+ significativamente più alti rispetto ai pazienti undetectable (detectable mediana=630 cells/µl, IQR=484-739 cells/µl vs undetectable mediana=117 cells/µl, IQR=62-291 cells/µl; p=0.04), nonché significativamente più bassi risultano i livelli di DNA virale cellulare rispetto ai sieropositivi undetectable (detectable mediana=17 copies/10^4 CD4, IQR=1-39 copies/10^4 CD4 vs undetectable mediana=495 copies/10^4 CD4, IQR=32-788 copies/10^4 CD4; p=0.03) (fig.31).

Nei soggetti naïve undetectable l'analisi dei livelli di replicazione virale ha evidenziato in 5 pazienti su 7 (71%) una viremia maggiore di 100000 copies/ml (mediana=173482 copies/ml, IQR=6119-834000 copies/ml), indicata come alta [135], invece solo 2 pazienti detectable su 5 (40%) presentano una carica virale al di sopra di 100000 copies/ml (mediana=76285 copies/ml, IQR=2946-135669 copies/ml) (fig.31).

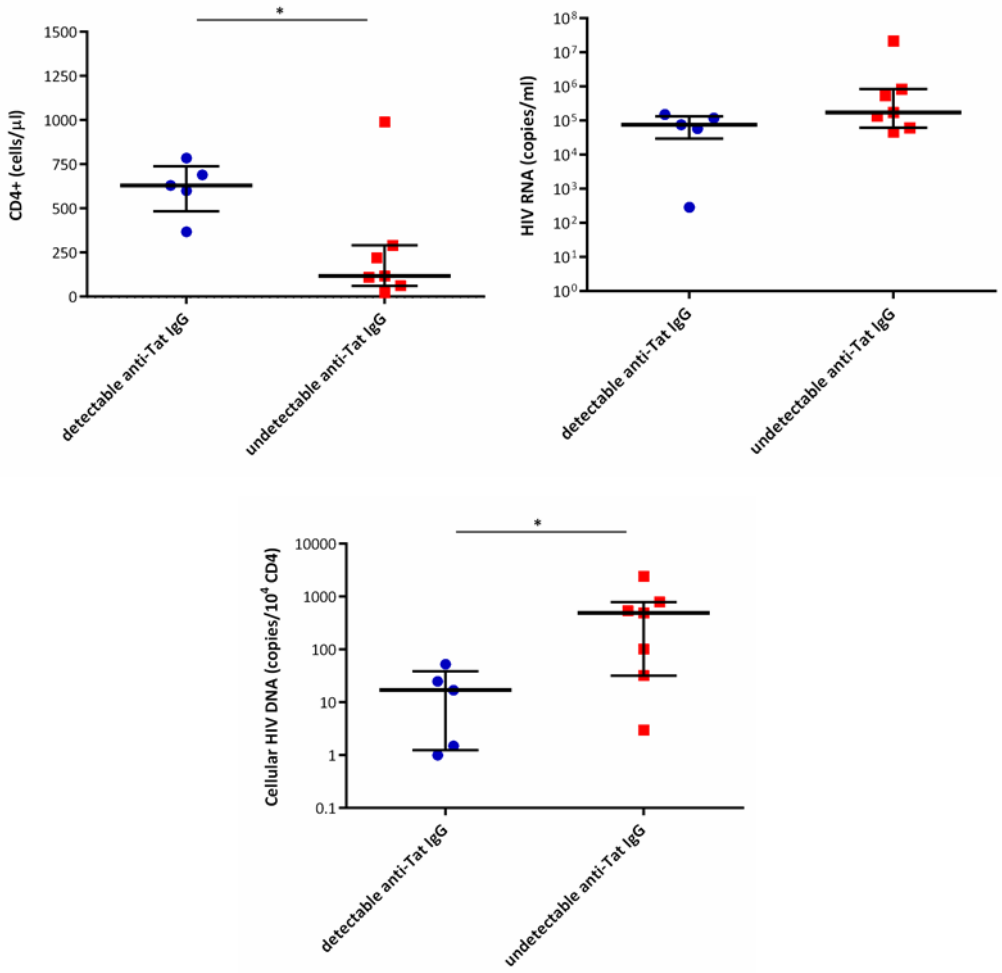


Figura 31. Sieropositivi non in terapia antiretrovirale (naïve): analisi di confronto dei livelli dei marcatori di monitoraggio dell'infezione. A livello di ciascuna distribuzione è indicata la mediana e le barre di errore rappresentano i valori di range interquartile (IQR). Per l'analisi di confronto è stato eseguito il Mann-Whitney test; *p≤0.05.

Un'analisi di confronto dei livelli di infezione tra soggetti sieropositivi detectable e undetectable è stata condotta anche nel gruppo di soggetti HIV-1 positivi che secondo il sistema di classificazione CDC (Centers for Disease Control and Prevention) hanno l'AIDS, appartenenti alle categorie A3, B3 e C1-C3 [136].

Sono stati individuati 38 pazienti con AIDS, dei quali 11 presentano una risposta IgG anti B-Tat detectable e 27 livelli non rilevabili di anticorpi anti B-Tat (fig.32).

Anche da questa valutazione emerge un contenimento della riduzione dei livelli di linfociti T CD4+ in presenza di IgG anti-Tat, registrando una conta linfocitaria T CD4+ significativamente più alta per il gruppo di pazienti detectable rispetto ai soggetti undetectable (detectable mediana=600 cells/µl, IQR= 437-743 cells/µl vs undetectable mediana=302 cells/µl, IQR=201-552 cells/µl; p=0.04) (fig.32).

Per quanto riguarda la valutazione dell'attività virale, confrontando i livelli di viremia non vi sono differenze tra i due gruppi a confronto, i pazienti per la maggior parte si presentano virologicamente soppressi (HIV RNA <50 copies/ml) (detectable mediana=49 copies/ml, IQR=49-124 copies/ml vs undetectable mediana=49 copies/ml, IQR=49-480 copies/ml). Degni di nota 11 sieropositivi undetectable su 27 (41%) con livelli di viremia considerevolmente più alti rispetto ai valori riferiti ai pazienti detectable, anche di tre di essi con carica virale più alta, circa 100 copie per ml (fig.32).

Differenze circa la dinamicità virale tra i due gruppi di sieropositivi sono meglio individuate dalla valutazione dei livelli di HIV DNA cellulare: è stato determinato per il gruppo di pazienti detectable un valore mediano di DNA virale più basso rispetto ai pazienti undetectable (detectable mediana=8 copies/10^4 CD4, IQR=2-22 copies/10^4 CD4 vs undetectable mediana=16 copies/10^4 CD4, IQR=12-57 copies/10^4 CD4) (fig.32), facendo registrare una significatività statistica borderline (p=0.08).

Valutazioni che denotano un miglior controllo dell'attività del virus in condizioni di risposta anticorpale anti-Tat rilevabile.

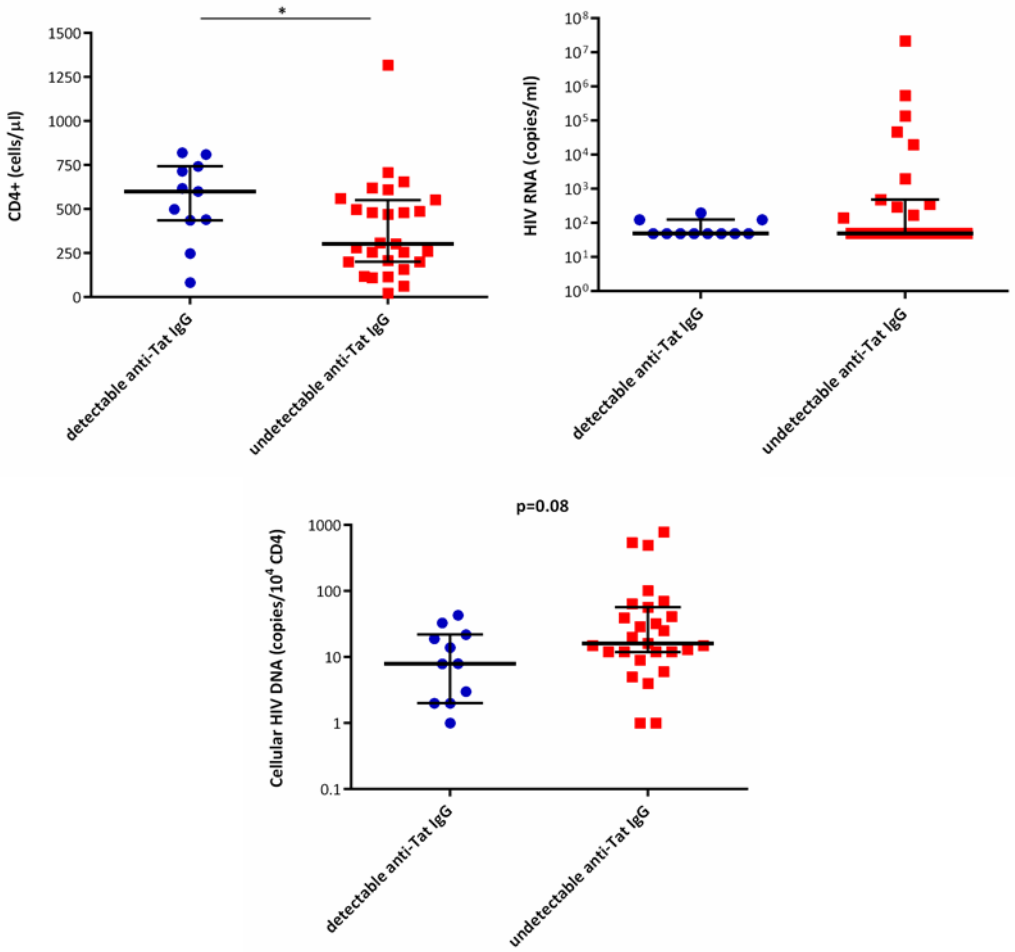


Figura 32. Pazienti HIV-1 positivi con AIDS secondo i criteri di classificazione del sistema CDC: analisi di confronto dei livelli dei marcatori di monitoraggio dell'infezione. Ai fini dell'analisi statistica i valori di carica virale <50 copies/ml sono stati indicati come 49 copies/ml; a livello di ciascuna distribuzione è indicata la mediana e le barre di errore rappresentano i valori di range interquartile (IQR). Per l'analisi di confronto è stato eseguito il Mann-Whitney test; *p≤0.05.

3.4 Analisi della risposta anticorpale anti-Tat clade B per i 26 soggetti sieropositivi "detectable"

I 26 campioni positivi alla risposta anticorpale anti B-Tat (detectable) sono stati sottoposti ad una valutazione della cross-clade reattività delle IgG anti B-Tat verso le 2 varianti dell'antigene Tat clade C.

Considerando i cut-off di riferimento relativi agli antigeni C30S31 C-Tat e C30C31 C-Tat, 0.283 e 0.295 rispettivamente, sono stati identificati 21 campioni (81%) con una risposta anticorpale anti-Tat cross-clade reattiva, le cui immunoglobuline G anti-Tat presenti sono in grado di riconoscere l'antigene Tat clade B così come almeno una delle due varianti clade C.

Analisi dei dati che ha, inoltre, messo in evidenza dei livelli di reattività per gli antigeni Tat clade C significativamente più bassi rispetto alla proteina del sottotipo virale B (fig.33).

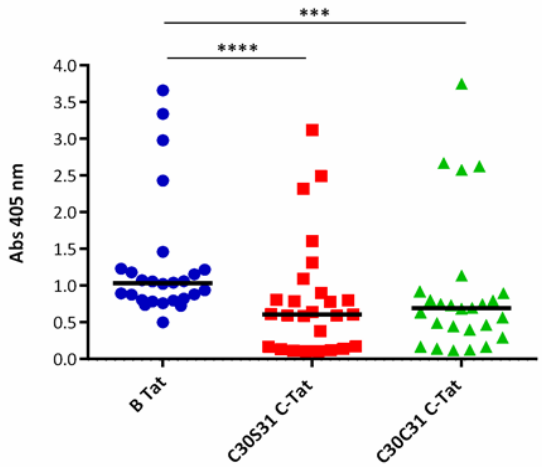


Figura 33. Valutazione dei livelli di reattività delle IgG anti-Tat rispetto ai tre antigeni virali.
Per ciascuna distribuzione sono indicati i valori di Abs a 405 nm relativi alla diluizione 1:50 (v/v) dei campioni. È indicato il valore mediano di Abs relativamente a ciascun antigene. Per l'analisi di comparazione è stato eseguito il Friedman test; ****p<0.0001.

Per ciascun campione sono stati calcolati i titoli anticorpali di IgG anti-Tat, per ogni variante dell'antigene, secondo i criteri descritti nel paragrafo 2.7 (fig.34).

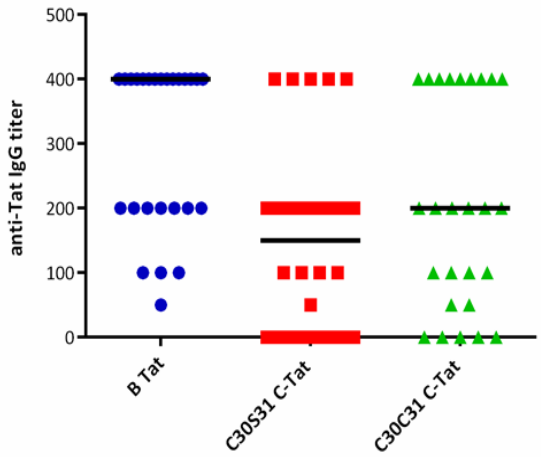


Figura 34. Distribuzione dei titoli anticorpali rispetto ai tre antigeni Tat. I 26 campioni IgG anti B-Tat detectable sono stati sottoposti ad una titolazione da 1:50 (v/v) a 1:400 (v/v), rispetto alle tre varianti di Tat. Sono qui riportati i titoli anticorpali definiti e per ogni distribuzione è indicato il valore mediano.

Relativamente ai livelli della risposta anticorpale anti B-Tat, sono stati individuati due sottogruppi: pazienti HIV-1 positivi con titolo anticorpale >200 (n=15) e soggetti sieropositivi con titolo ≤200 (n=11).

Per quanto riguarda i 15 soggetti sieropositivi con titolo anti B-Tat >200, sono stati evidenziati alti livelli di IgG anche rispetto ai due antigeni C-Tat tale da registrare una mediana dei titoli anticorpali pari a 200 per entrambe le varianti della proteina (fig.35 A), nonché è stata evidenziata un'alta cross-clade reattività della risposta IgG anti-Tat, con pari livelli di reattività per le tre varianti della proteina (fig.35 B).

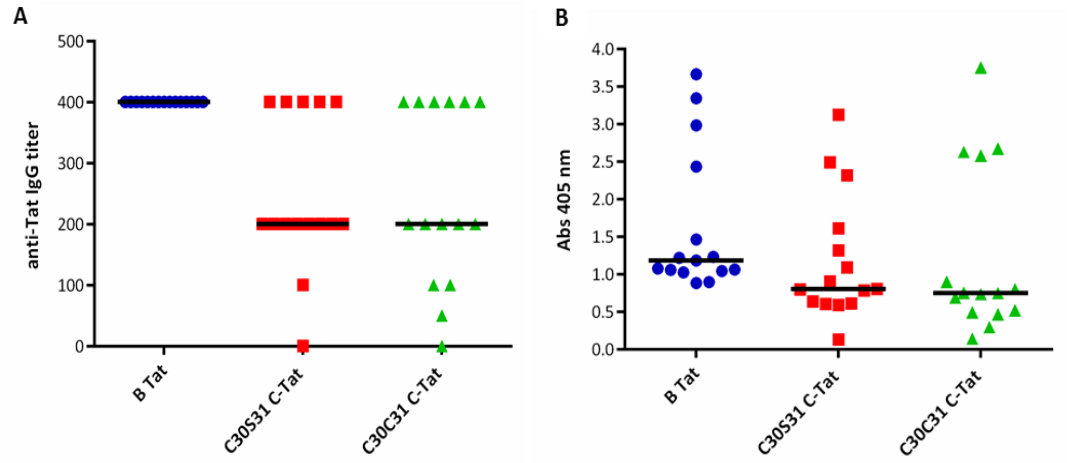


Figura 35. (A) Valutazione dei titoli anticorpali. (B) Analisi dei livelli di reattività della risposta IgG rispetto ai tre antigeni Tat, relativamente ai 15 sieropositivi con titolo anticorpale anti B-Tat >200. A livello delle distribuzioni dei titoli anticorpali è indicato il valore mediano. Il valore mediano è riportato anche per quanto riguarda le distribuzioni dei valori di Abs rispetto ai tre antigeni Tat. L'analisi di comparazione dei livelli di reattività è stata eseguita con il Friedman test.

Per gli 11 pazienti con titolo anticorpale anti B-Tat ≤200 sono stati determinati bassi titoli di IgG anche rispetto agli antigeni clade C (fig.36 A), così come bassi sono i livelli di cross-clade reattività degli anticorpi anti-Tat verso le due varianti C-Tat rispetto alla Tat clade B (fig.36 B).

La risposta anticorpale IgG anti B-Tat presenta una moderata capacità di "cross-clade recognition".

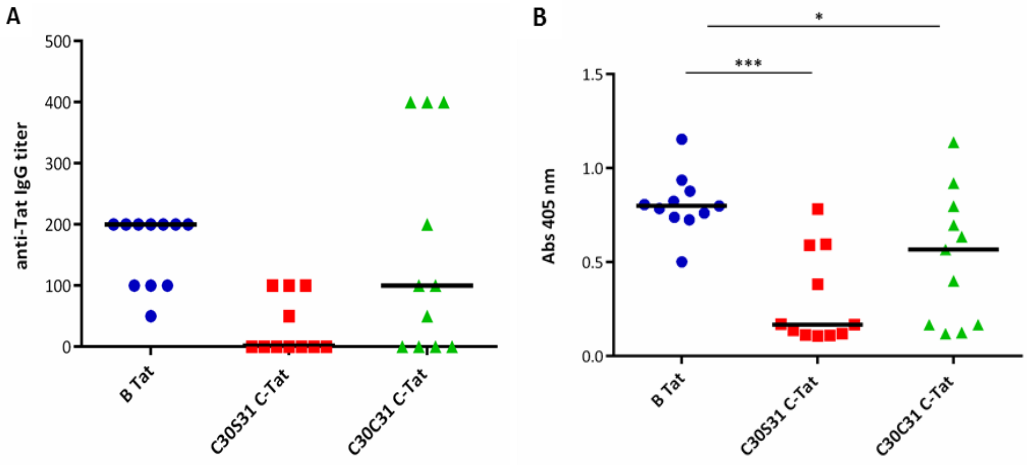


Figura 36. (A) Valutazione dei titoli anticorpali. (B) Analisi dei livelli di reattività della risposta IgG rispetto ai tre antigeni Tat, relativamente agli 11 sieropositivi con titolo anticorpale anti B-Tat ≤200. A livello delle distribuzioni dei titoli anticorpali è indicato il valore mediano. Il valore mediano è riportato anche per quanto riguarda le distribuzioni dei valori di Abs rispetto ai tre antigeni Tat. L'analisi di comparazione dei livelli di reattività è stata eseguita con il Friedman test; ***p<0.001, *p≤0.05.

Tali due sottogruppi di sieropositivi sono stati oggetto di un'analisi di confronto dei livelli di infezione, mediante valutazione dei markers di monitoraggio dell'infezione virale.

Dalle analisi effettuate, è stato osservato che i sieropositivi con titolo anticorpale anti B-Tat >200 presentano una mediana della conta linfocitaria T CD4+ più bassa (mediana=630 cells/µl, IQR=441-785 cells/µl) rispetto ai pazienti con titolo anti B-Tat ≤200 (mediana=811 cells/µl, IQR=600-1080 cells/µl) (fig.37), risultato degno di nota ai limiti della significatività statistica (p=0.10).

Relativamente alla valutazione dei livelli di replicazione virale, seppur i gruppi a confronto presentano entrambi una mediana della carica virale pari a 49 copies/ml, è da sottolineare che il 47% dei pazienti con titolo anti B-Tat >200 (6 su 15 pazienti) risulta virologicamente non soppresso (HIV RNA >50 copies/ml) rispetto il 27% dei sieropositivi con titolo IgG anti B-Tat ≤200 (3 su 11 pazienti) (fig.37); pazienti che, inoltre, mostrano livelli di DNA virale cellulare più alti (mediana=14 copies/10^4 CD4, IQR=7-25 copies/10^4 CD4) rispetto ai sieropositivi con titolo anti B-Tat ≤200 (mediana=6 copies/10^4 CD4, IQR=1.6-8.5 copies/10^4 CD4), con una significatività statistica borderline (p=0.07) (fig.37).

Si presenta un quadro di infezione più critico per i pazienti HIV-1 positivi con alti livelli di IgG anti B-Tat (titolo >200) e, al contempo, alti livelli di cross-clade reattività.

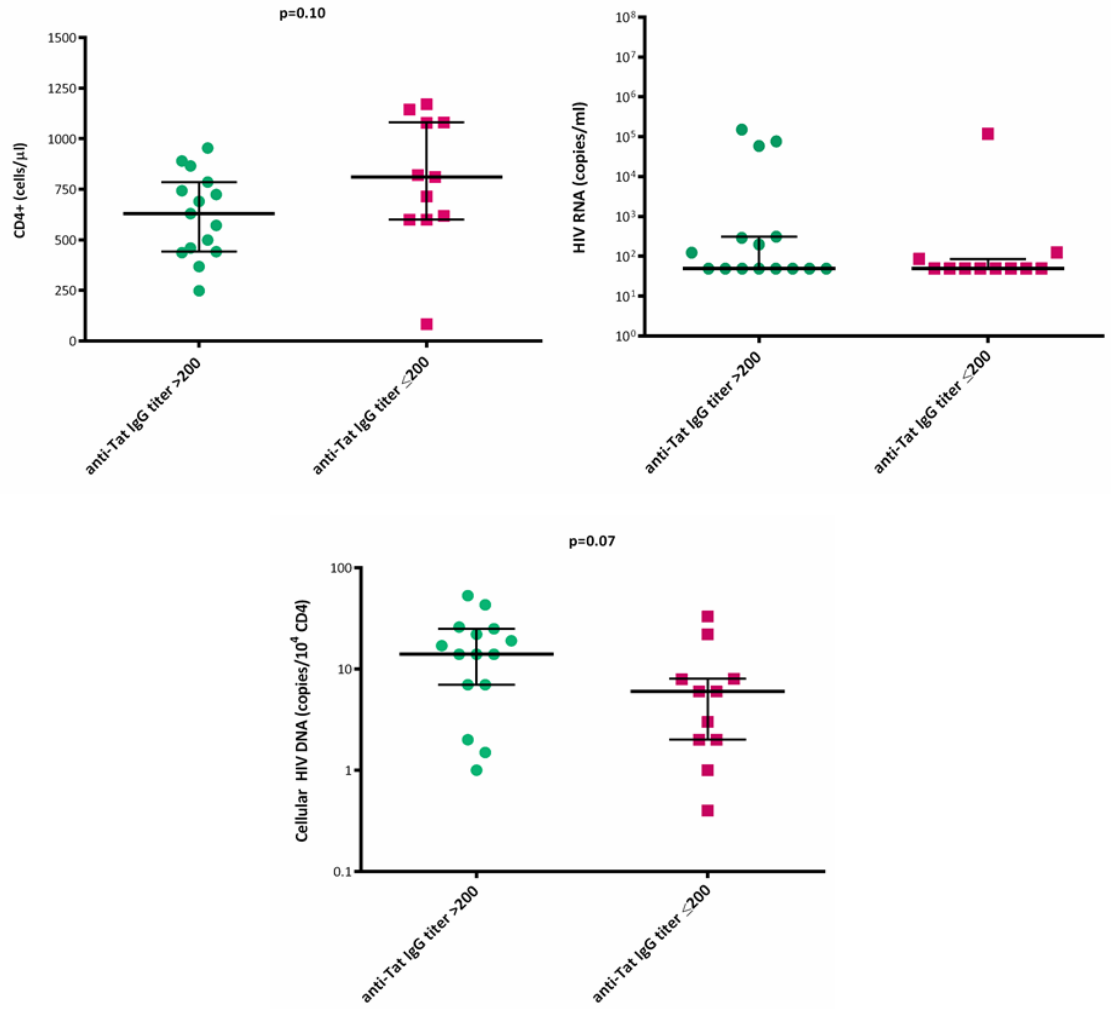


Figura 37. Analisi di confronto dei livelli dei marcatori di monitoraggio dell'infezione: sieropositivi con titolo anti B-Tat >200 vs sieropositivi con titolo anti B-Tat ≤200. Ai fini dell'analisi statistica i valori di carica virale <50 copies/ml sono stati indicati come 49 copies/ml; a livello di ciascuna distribuzione è indicata la mediana e le barre di errore rappresentano i valori di range interquartile (IQR). Per l'analisi di confronto è stato eseguito il Mann-Whitney test.

3.5 Analisi epitope-mapping degli anticorpi anti-Tat per i campioni IgG anti B-Tat detectable: titolo IgG anti B-Tat >200 vs titolo IgG anti B-Tat ≤200

Visti i risultati evidenziati nei due sottogruppi di sieropositivi IgG anti B-Tat detectable, si è pensato di caratterizzare lo stato della risposta anticorpale Tat specifica verificando la reattività delle IgG anti-Tat verso la regione N-terminale, notoriamente molto immunogenica e fortemente coinvolta nell'attività di transattivazione della proteina virale [60-62], e inoltre verso il dominio basico, anch'esso epitopo immunoreattivo ed interessato nel processo di uptake cellulare "eparan-solfato dipendente" di Tat e nell'interazione Tat-TAR RNA [59, 75, 76, 137].

Alcuni studi hanno anche descritto l'importanza della regione N-terminale per la funzione di transattivazione della proteina Tat, così come per l'interazione Tat-TAR RNA e il suo coinvolgimento nel processo di internalizzazione cellulare della proteina, indipendentemente dal dominio basico [62, 138, 139].

I campioni sono stati testati in ELISA rispetto al peptide N-terminale aa 1-15 e alla regione basica aa 46-60.

Per il gruppo di campioni con titolo IgG anti B-Tat >200, non sono state apprezzate differenze circa i livelli di reattività degli anticorpi Tat specifici rispetto ai due peptidi (fig.38 A); invece, si mostrano più alti i livelli di reattività verso il peptide aa 1-15 rispetto al peptide aa 46-60 nei sieropositivi con titolo IgG anti B-Tat ≤200, con significatività statistica borderline (p=0.08) (fig.38 B).

Mettendo a confronto tra i due gruppi di pazienti i valori di Abs determinati rispetto sia al peptide aa 1-15 che al dominio basico aa 46-60, si è osservato che se relativamente al peptide aa 46-60 non si può parlare di differenze importanti circa i livelli di reattività degli anticorpi Tat specifici (Abs mediana=0.497 vs 0.778; p=0.41) tra i due gruppi di sieropositivi (fig.39 A), risulta, invece, una reattività più bassa delle IgG anti-Tat verso il peptide N-terminale nei sieropositivi con titolo IgG anti B-Tat >200, quasi

statisticamente significativa, rispetto al gruppo di sieropositivi con titolo ≤200 (Abs mediana=0.664 vs 0.933; p=0.06) (fig.39 B).

Valutazioni che presentano un differente stato della risposta anticorpale anti-Tat rispetto ai due domini della proteina virale presi in esame, confrontando i due sottogruppi di sieropositivi "detectable".

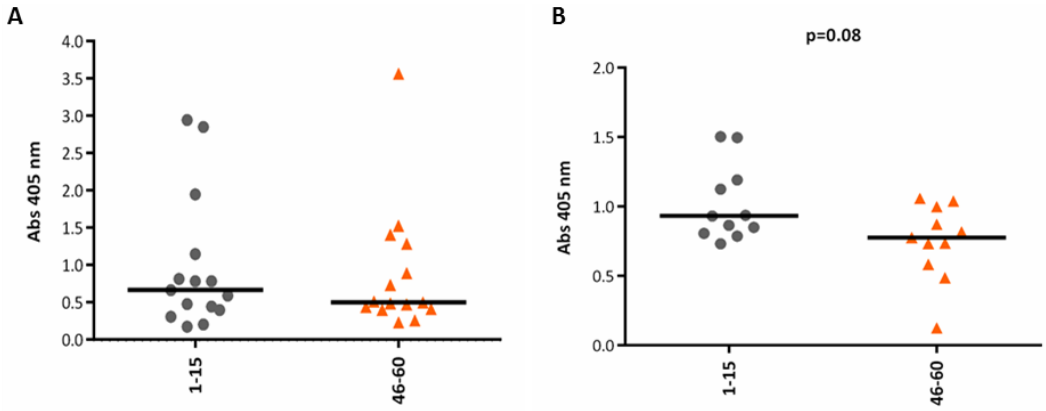


Figura 38. Valutazione della reattività della risposta anticorpale anti-Tat rispetto ai peptidi aa 1-15 e aa 46-60: (A) Sottogruppo dei sieropositivi con titolo IgG anti B-Tat >200; (B) Sottogruppo dei sieropositivi con titolo IgG anti B-Tat ≤200. A livello delle distribuzioni dei valori di assorbanza a 405 nm è indicato il valore mediano. Analisi della reattività eseguita mediante il Wilcoxon test.

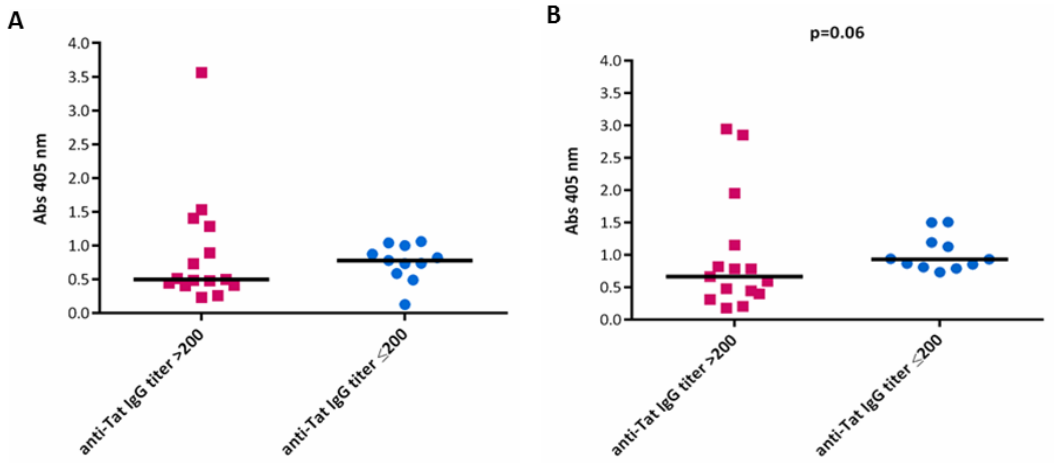


Figura 39. Analisi di confronto dei livelli di reattività della risposta IgG anti-Tat: (A) rispetto al peptide aa 46-60; (B) rispetto al peptide aa 1-15 (sieropositivi con titolo IgG anti B-Tat >200 vs sieropositivi con titolo anti B-Tat ≤200). A livello delle distribuzioni dei valori di assorbanza a 405 nm è indicato il valore mediano. Comparazione dei livelli di reattività eseguita mediante il Mann-Whitney test.

3.6 Valutazione della presenza e cross-clade reattività delle IgG anti-Tat nella coorte di pazienti HIV-1 positivi provenienti da paesi Africani

I 21 soggetti sieropositivi Africani sono stati oggetto di valutazione per la "cross-clade recognition" degli anticorpi anti-Tat circolanti verso le tre varianti di Tat prese in considerazione.

Tenendo conto dei valori di cut-off di riferimento definiti per i tre antigeni virali, sono stati individuati 6 campioni (76X, 190J, 204X, 209C, 220N e 221O) con una risposta IgG anti-Tat "cross-clade reattiva" (fig.40) e 13 con una risposta anticorpale "no cross-clade reattiva". In particolare, 7 campioni (183C, 186F, 187G, 218L, 230X, 256G e 261L) con risposta "no cross-clade reattiva" presentano IgG contro entrambe le varianti di Tat clade C e 6, invece, specifiche per il solo antigene C30C31 C-Tat (9I, 174R, 175S, 181A, 189I e 233A) (fig.40).

Per due pazienti (193M e 259J) non sono stati rilevati anticorpi Tat specifici (fig.40).

L'analisi dei dati ELISA sull'intera coorte di sieropositivi Africani ha messo in evidenza una maggiore presenza di anticorpi specifici contro le varianti C e soprattutto verso l'antigene C30C31 C-Tat, con valori significativamente più alti rispetto al clade B (fig.41). Significativamente diversa è anche l'affinità di questi anticorpi tra le due varianti del clade C come evidenziato in figura 41, infatti la reattività verso l'antigene C30C31 C-Tat è significativamente più alta rispetto alla variante C30S31 C-Tat.

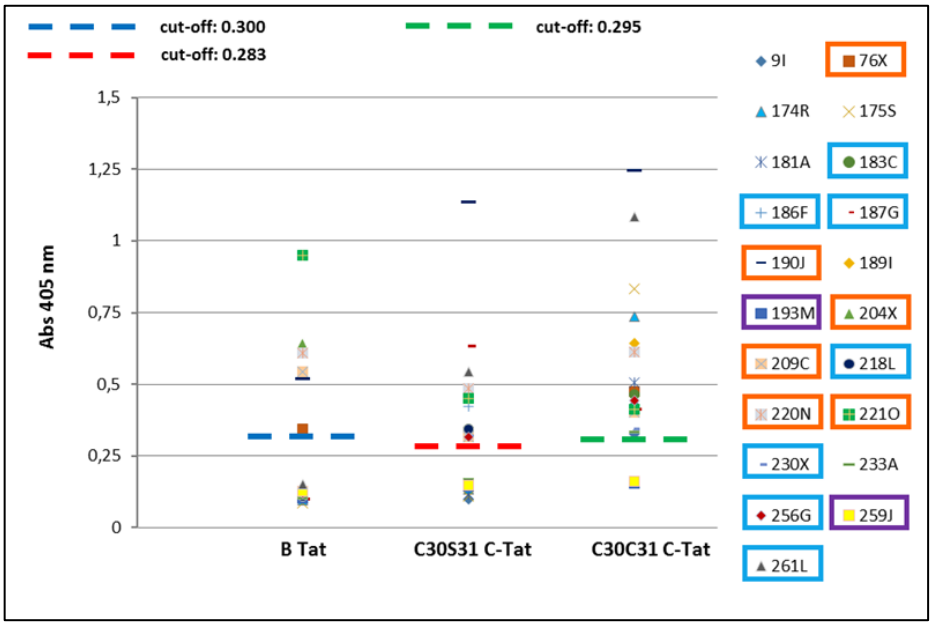


Figura 40. Valutazione della risposta IgG anti-Tat per i 21 soggetti sieropositivi Africani.
Sono riportati per ciascun campione, relativamente ai tre antigeni Tat, il valore medio di due saggi ELISA indipendenti; diluizione dei campioni 1:50 (v/v) in triplicato. Sono delineati in arancione i 6 campioni con risposta IgG anti-Tat "cross-clade reattiva", in azzurro i 7 campioni con IgG reattive verso entrambe le varianti C-Tat e in viola i due campioni con anticorpi Tat specifici "undetectable". I 6 campioni non contrassegnati presentano IgG verso il solo antigene C30C31 C-Tat. In grafico sono indicati i tre cut-off di riferimento.

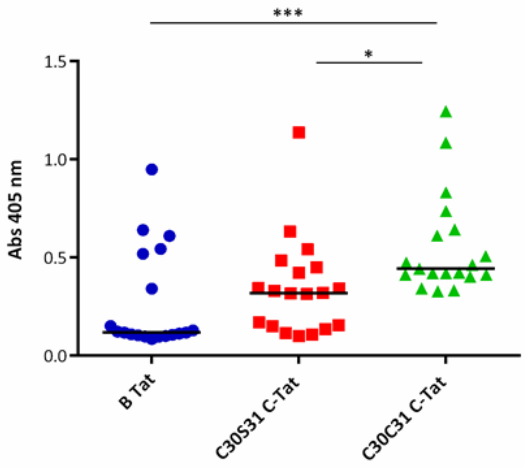


Figura 41. Affinità delle IgG anti-Tat rispetto ai tre antigeni virali. Per ciascuna distribuzione sono indicati i valori di Abs a 405 nm relativi alla diluizione 1:50 (v/v) dei campioni Africani (sono stati esclusi i due campioni "undetectable"). È indicato il valore mediano di Abs relativamente a ciascun antigene. Per l'analisi di comparazione è stato eseguito il Friedman test; ***$p<0.001$, *$p\leq0.05$.

I risultati dei test ELISA, relativi a ciascun paziente, sono stati confermati da valutazioni Western Immunoblotting. In figura 42 sono mostrati i risultati dei saggi ELISA e Western Immunoblotting di alcuni campioni rappresentativi della coorte di pazienti sieropositivi Africani.

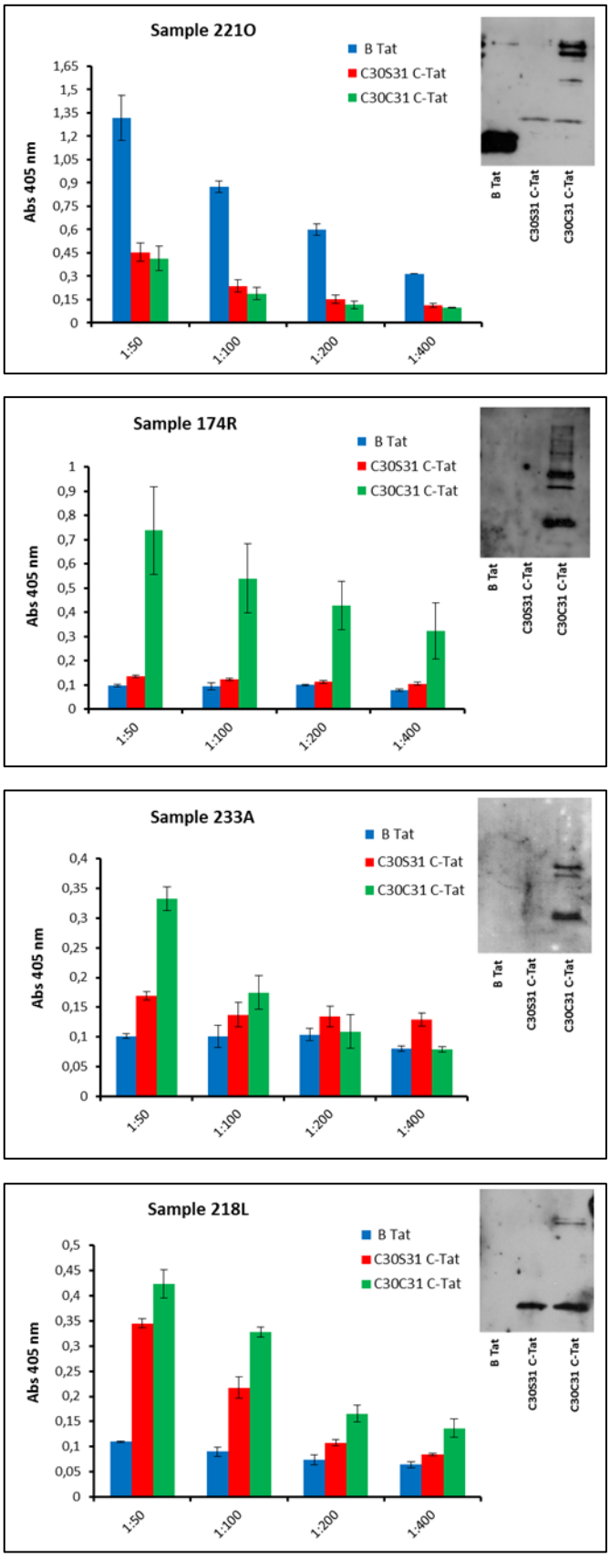


Figura 42. Valutazione ELISA e Western Immunoblotting della risposta anticorpale anti-Tat.
Sono mostrati i risultati della titolazione in ELISA (è riportato il valore medio ± SD risultante di due saggi immunoenzimatici indipendenti; ciascuna diluizione è stata valutata in triplicato) e dell'analisi Western Immunoblotting (eseguita come descritto nel paragrafo 2.8), rispetto alle tre varianti Tat, del campione 221O con risposta anticorpale "cross-clade reattiva" e dei campioni 174R, 233A e 218L con risposta IgG "no cross-clade reattiva".

3.7 Analisi della risposta IgG anti-Tat in relazione con i livelli di infezione virale

I due gruppi di sieropositivi, "cross-clade reattivi" e "no cross-clade reattivi", identificati tra i pazienti Africani, dei quali in tabella 15 sono indicate le caratteristiche cliniche, sono stati sottoposti ad un'analisi di confronto dei livelli di infezione comparando i valori dei markers di monitoraggio dell'infezione virale.

Characteristics	**All subjects n=21**
Sex, n (%)	
M	7 (33,3%)
F	14 (66,7%)
Age, median years (IQR)[a]	43.5 (36-52)
Coinfection, n (%)[a]	7 (35%)
CDC classification, n (%)[a]	
AIDS (A3, B3, C1-C3)	13 (65%)
no AIDS (A1, A2, B1, B2)	7 (35%)
CD4+ T cell count, median cells/µl (IQR)	658 (365-819)
HIV RNA load, median copies/ml (IQR)	49 (49-1098.5)
Cellular HIV DNA, median copies/10^4 CD4 (IQR)	6.3 (3-22.5)
Years from diagnosis, median years(IQR)[a]	8 (5-10)
ART, n (%)[a]	17 (85%)
no ART, n (%)	3 (15%)
Years on ART, median years (IQR)[b]	7.5 (2-11)

Tabella 15. Caratteristiche cliniche dei 21 pazienti HIV-1 positivi Africani. [a]Di un paziente non si hanno informazioni; [b]Di due pazienti non si hanno informazioni.

L’analisi di confronto ha messo in evidenza una conta linfocitaria T CD4+ più alta per i sieropositivi con risposta IgG anti-Tat “cross-clade reattiva” (CD4+ mediana=791 vs 499 cells/µl) (fig.43), quasi significativa (p=0.06), oltre che moderata attività virale con viremia plasmatica significativamente più bassa rispetto ai pazienti con risposta anticorpale “no cross-clade reattiva” (HIV RNA mediana=49 vs 629 copies/ml; p=0.047) e livelli di DNA virale cellulare significativamente più bassi (HIV DNA cellulare mediana=2.5 vs 16 copies/10^4 CD4; p=0.009) (fig.43).

Abbiamo, inoltre, messo in correlazionare la risposta anticorpale verso tutte le varianti di Tat, prendendo in considerazione i titoli anticorpali, e i livelli di infezione rilevati in ogni paziente.

L’analisi non ha rilevato alcun tipo di relazione tra livelli di infezione e presenza di IgG contro la variante C30S31 C-Tat, così come per la variante C30C31 C-Tat (fig.44 e 45).

Al contrario, nei pazienti che hanno prodotto una risposta contro la variante B-Tat sussiste una relazione apprezzabile tra titolo anticorpale e aumento di linfociti T CD4+ (r=0.4173) (fig.46) e una diminuzione dei livelli di carica virale (r=-0.4908), nonché di DNA virale cellulare (r=-0.5301) (fig.46).

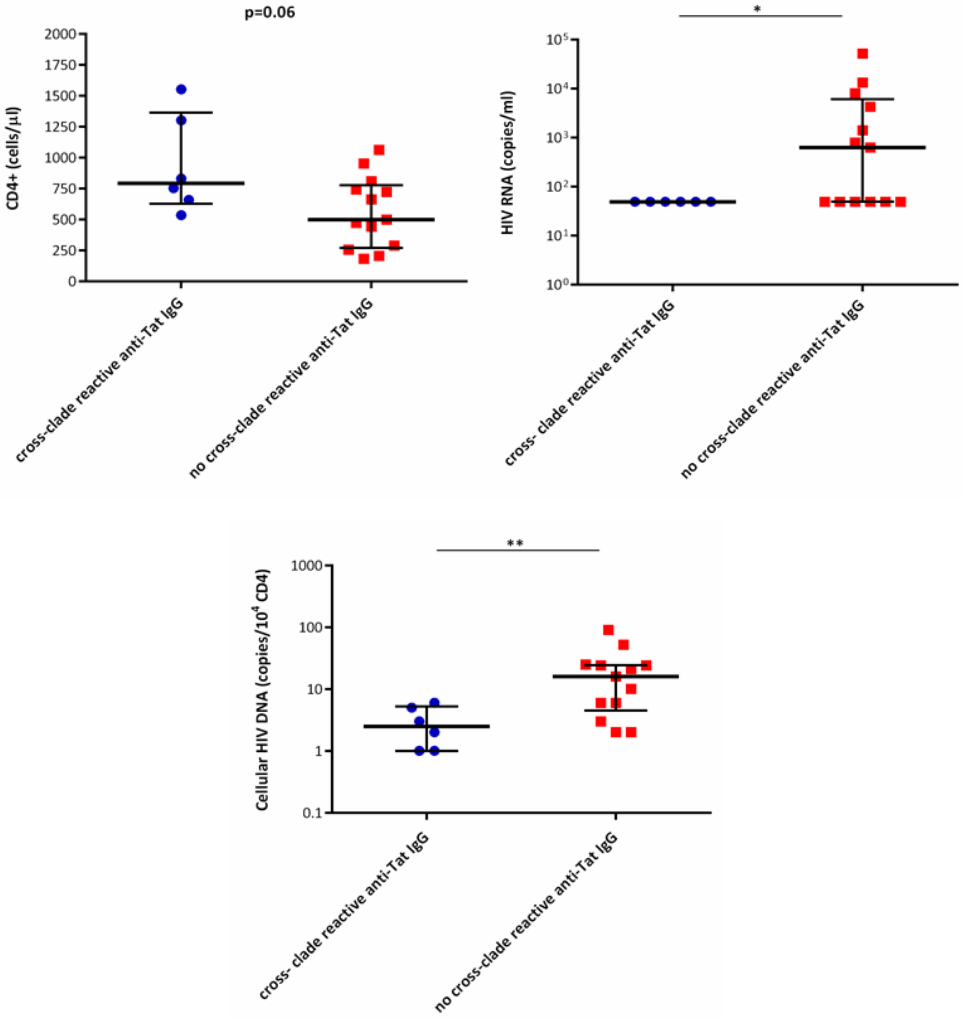


Figura 43. Analisi di confronto dei livelli dei marcatori di monitoraggio dell'infezione da HIV-1: sieropositivi con risposta IgG anti-Tat "cross-clade reattiva" (n=6) vs sieropositivi con risposta IgG anti-Tat "no cross-clade reattiva" (n=13). Sono stati esclusi dall'analisi di confronto i due campioni con IgG anti-Tat undetectable. Ai fini dell'analisi statistica i valori di carica virale <50 copies/ml sono stati indicati come 49 copies/ml; a livello di ciascuna distribuzione è indicata la mediana e le barre di errore rappresentano i valori di range interquartile (IQR). Per l'analisi di confronto è stato eseguito il Mann-Whitney test; *p≤0.05.

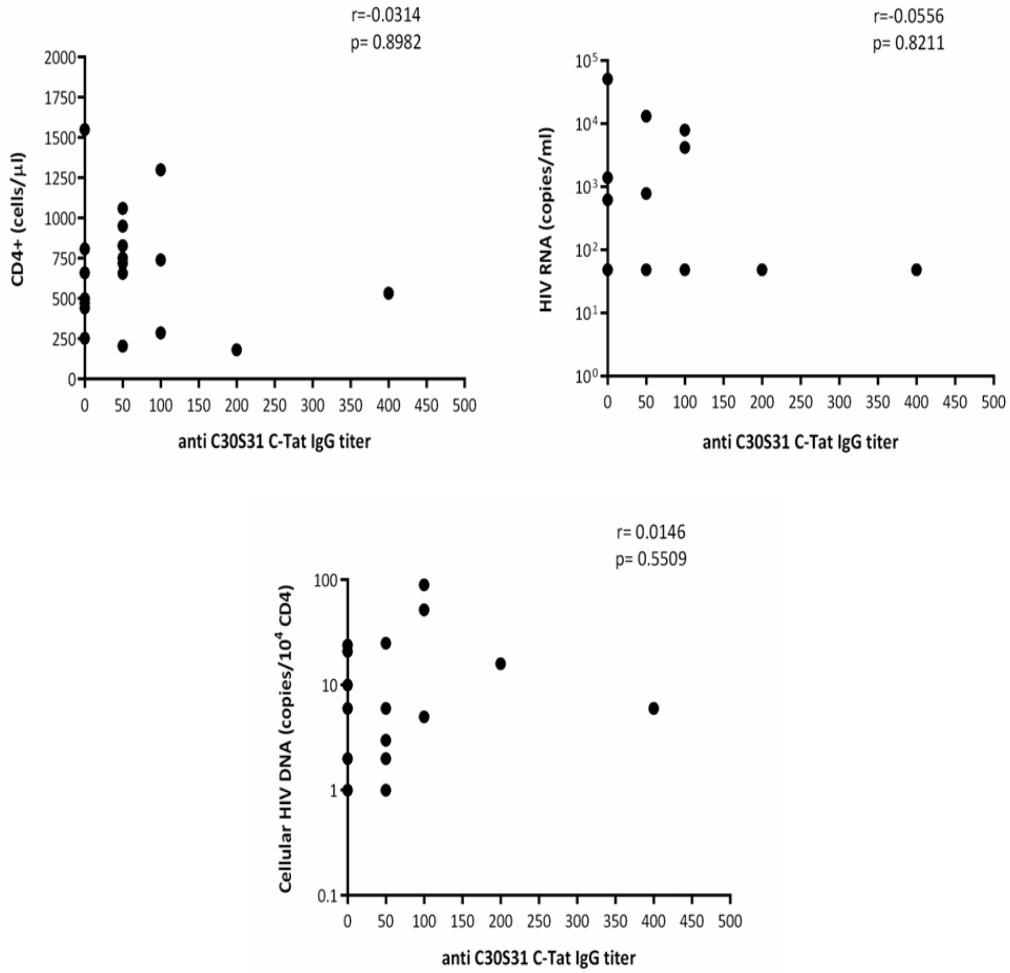


Figura 44. Correlazione tra risposta IgG anti C30S31 C-Tat reattiva e i livelli di infezione virale. Sono stati esclusi dall'analisi i due campioni con IgG anti-Tat undetectable. Sono stati correlati i titoli anticorpali relativi alla risposta IgG anti C30S31 C-Tat e i valori dei markers di monitoraggio dell'infezione virale. L'analisi di correlazione è stata eseguita con il test di correlazione di Spearman.

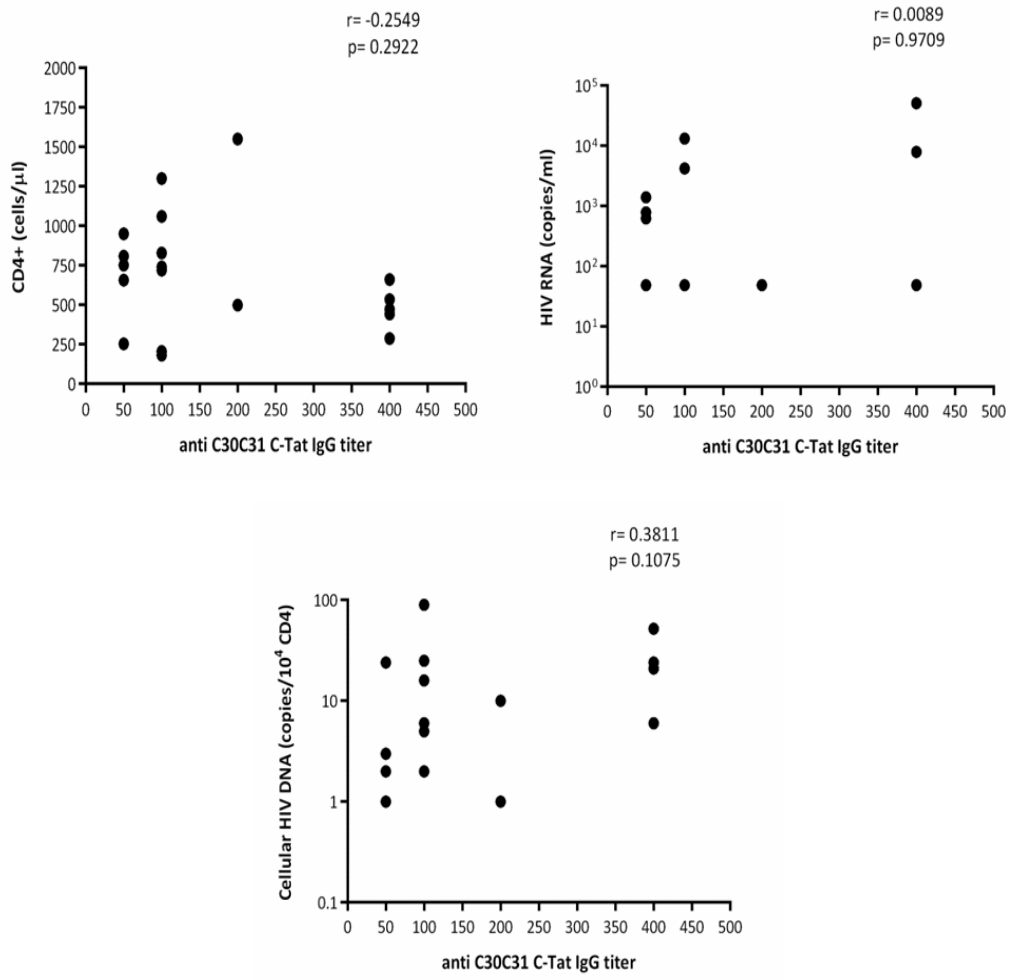


Figura 45. Correlazione tra risposta IgG anti C30C31 C-Tat reattiva e i livelli di infezione virale. Sono stati esclusi dall'analisi i due campioni con IgG anti-Tat undetectable. Sono stati correlati i titoli anticorpali relativi alla risposta IgG anti C30C31 C-Tat e i valori dei markers di monitoraggio dell'infezione virale. L'analisi di correlazione è stata eseguita con il test di correlazione di Spearman.

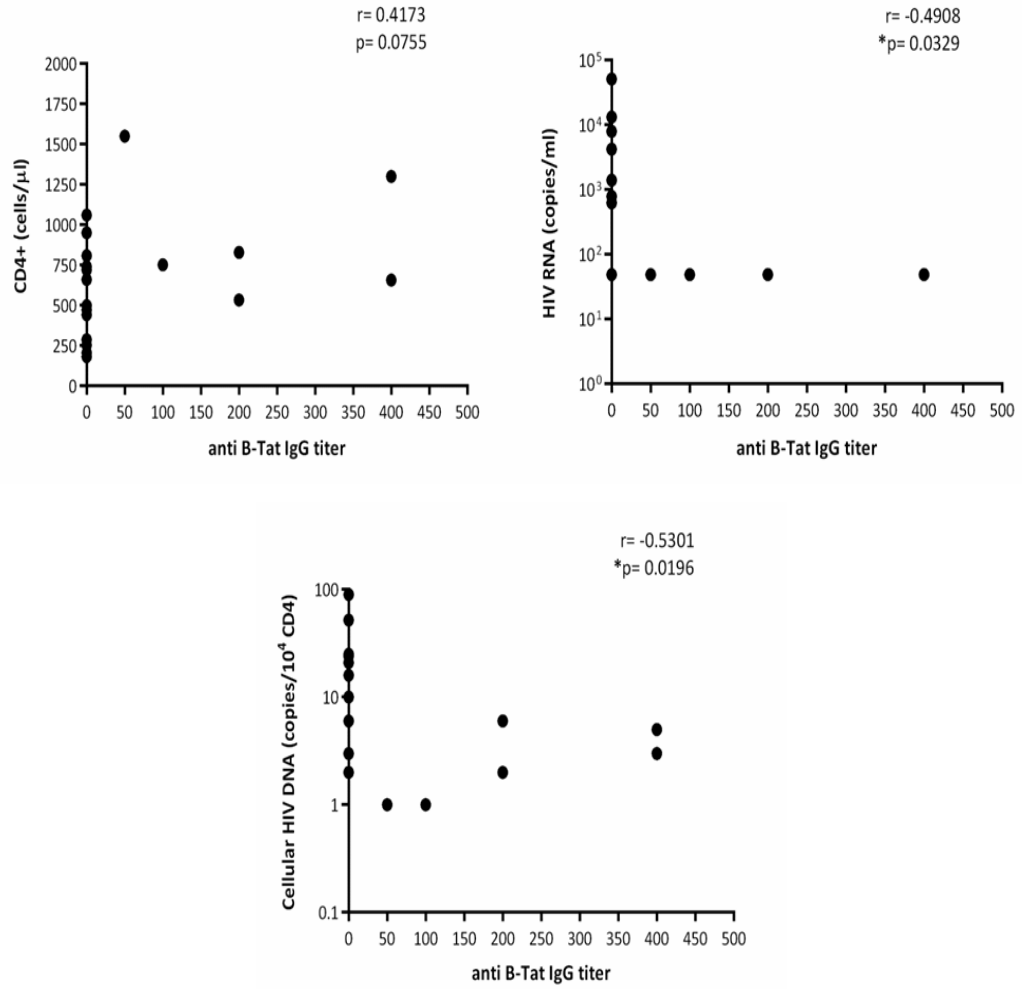


Figura 46. Correlazione tra risposta IgG anti B-Tat reattiva e i livelli di infezione virale.
Sono stati esclusi dall'analisi i due campioni con IgG anti-Tat undetectable. Sono stati correlati i titoli anticorpali relativi alla risposta IgG B-Tat e i valori dei markers di monitoraggio dell'infezione virale. L'analisi di correlazione è stata eseguita con il test di correlazione di Spearman.

3.8 Analisi epitope-mapping degli anticorpi anti-Tat: sieropositivi con risposta IgG anti-Tat "cross-clade reattiva" vs sieropositivi con risposta IgG anti-Tat "no cross-clade reattiva" nella coorte Africana

I due gruppi di soggetti sieropositivi individuati nella coorte Africana sono stati oggetto di un'analisi di caratterizzazione della risposta anticorpale Tat specifica, valutando la reattività delle IgG anti-Tat rispetto al dominio N-terminale (peptide aa 1-15) e alla regione basica (peptide aa 46-60) della proteina virale.

Per quanto riguarda i sieropositivi con risposta IgG anti-Tat "cross-clade reattiva", è stata evidenziata un'attività anticorpale degli anticorpi Tat specifici significativamente più alta sul dominio N-terminale piuttosto che sulla regione basica (fig.47 A).

Al contrario, nei pazienti HIV-1 positivi con una risposta anticorpale "no cross-clade reattiva" si è registrata una immunoreattività più bassa sul peptide aa 1-15 rispetto al peptide aa 46-60 (fig.47 B).

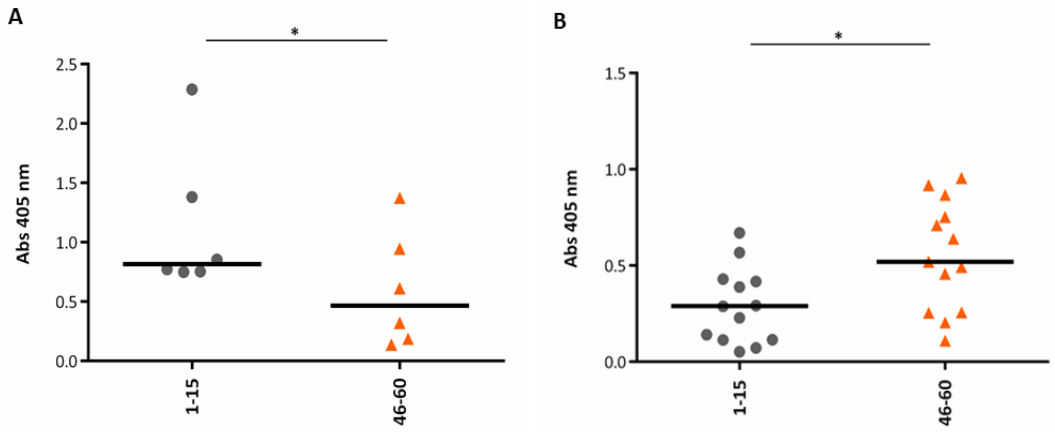


Figura 47. Valutazione della reattività della risposta anticorpale anti-Tat rispetto ai peptidi aa 1-15 (N-terminale) e aa 46-60 (dominio basico) in sieropositivi Africani con risposta anticorpale anti-Tat: (A) "cross-clade reattiva"; (B) "no cross-clade reattiva". A livello delle distribuzioni dei valori di assorbanza a 405 nm è indicato il valore mediano. Analisi della reattività eseguita mediante il Wilcoxon test; *p≤0.05.

Confrontando i valori di Abs nei due gruppi di pazienti per entrambi i peptidi della proteina Tat, è emerso che non sussistono differenze di immunoreattività contro il peptide aa 46-60 (Abs mediana=0.467 vs 0.521; p=0.86) tra i due gruppi di sieropositivi (fig.48 A); invece, nei sieropositivi con risposta IgG anti-Tat "cross-clade reattiva" è significativamente più alta la reattività della risposta anticorpale per il peptide aa 1-15 (fig.48 B).

Si presenta, quindi, un differente assetto della risposta anticorpale anti-Tat rispetto alle due regioni della proteina virale tra i due gruppi di soggetti sieropositivi messi a confronto.

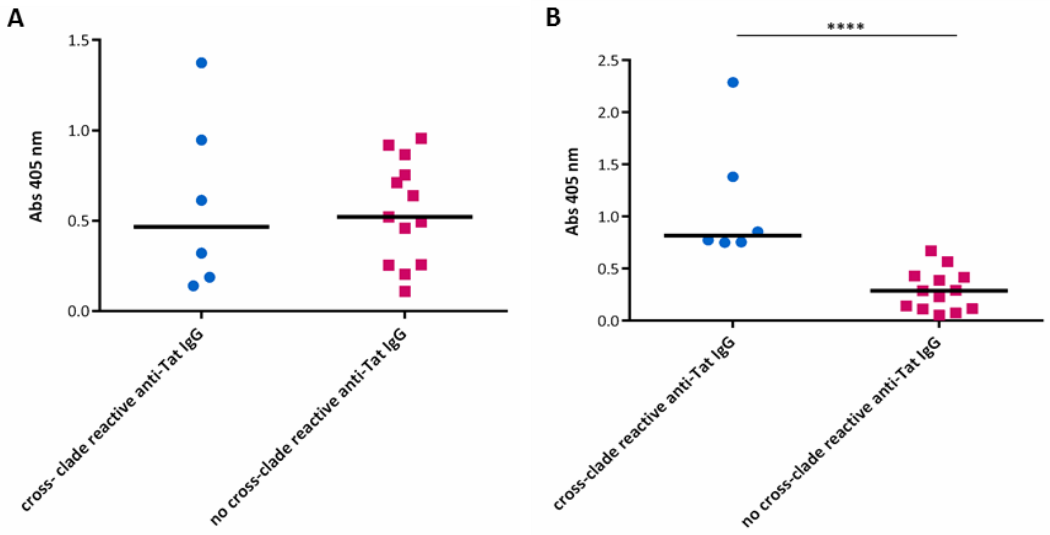


Figura 48. Analisi di confronto dei livelli di reattività della risposta IgG anti-Tat rispetto ai due peptidi di Tat in sieropositivi con risposta IgG anti-Tat "cross-clade reattiva" vs sieropositivi con risposta IgG anti-Tat "no cross-clade reattiva": (A) peptide aa 46-60; (B) peptide aa 1-15.
A livello delle distribuzioni dei valori di assorbanza a 405 nm è indicato il valore mediano. Comparazione dei livelli di reattività eseguita mediante il Mann-Whitney test; ****p<0.0001.

3.9 Determinazione dei sottotipi di HIV-1 infettanti i soggetti sieropositivi Africani

Sui campioni dei pazienti Africani, che dalle informazioni fornite dal personale medico provengono da diverse regioni dell'Africa con differente distribuzione dei sottotipi del virus HIV-1 [140] (fig.49), al fine di avere un quadro più chiaro e completo dell'infezione, si è andati a determinare il clade virale infettante.

È stata condotta un'analisi delle sequenze relative alla regione p6/p7 gag, come descritto nel paragrafo 2.12.

È importante precisare che per tre campioni (76X, 233A e 259J) non è stato possibile determinare il sottotipo di HIV-1 per insufficiente quantitativo di DNA a disposizione da sottoporre ad analisi.

Dalla valutazione dei dati ottenuti, abbiamo constatato che i clade virali identificati, relativamente a ciascun paziente, rispecchiano quella che è la distribuzione dei sottotipi del virus nelle diverse aree dell'Africa di loro provenienza (tab.16, fig.49).

Abbiamo verificato che i sieropositivi 220N e 221O, presentanti una risposta anti-Tat "cross-clade reattiva", risultano essere stati infettati dal clade virale B (tab.16); invece, i pazienti 190J, 204X e 209C, sempre con risposta anticorpale "cross-clade reattiva" rispetto agli antigeni Tat considerati, sono stati infettati dalla forma virale ricombinante CRF 02_AG (tab.16).

Relativamente ai pazienti per i quali è stata definita una risposta IgG anti-Tat "no cross-clade reattiva", i cui anticorpi riconoscono le due varianti della proteina C-Tat, abbiamo individuato i sottotipi G (181A e 183C), A (sotto-sottotipo A1) (189I), 02_AG (indicato come A1,G dal database jpHMM) (174R, 175S, 186F, 187G, 218L, 230X, 256G e 261L) e C/D (9I) come clade virali infettanti (tab.16).

Il sottotipo virale C, invece, è risultato responsabile dell'infezione per il solo paziente 193M (tab.16), con una risposta IgG anti-Tat undetectable.

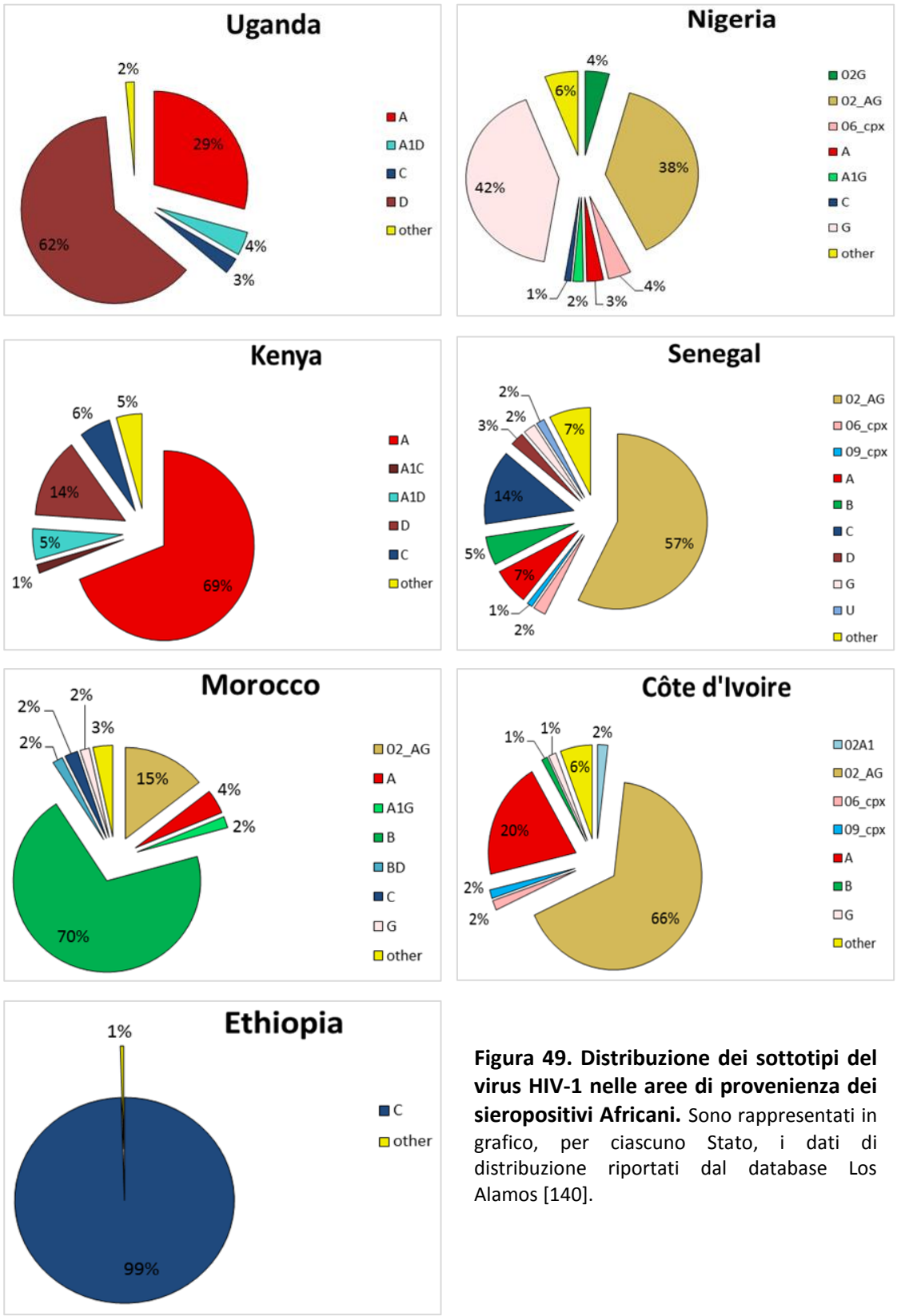


Figura 49. Distribuzione dei sottotipi del virus HIV-1 nelle aree di provenienza dei sieropositivi Africani. Sono rappresentati in grafico, per ciascuno Stato, i dati di distribuzione riportati dal database Los Alamos [140].

Sample	Nation	COMET	jpHMM	HIV Blast	NCBI Genotyping tool
9I	**Uganda**	C,D	C,D	C,D	C,D
174R	**Nigeria**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG
175S	**Nigeria**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG
181A	**Senegal**	G	G	G	G
183C	**Senegal**	G	G	G	G
186F	**Nigeria**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG
187G	**Nigeria**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG
189I	**Kenya**	A1	A1	A1	A1
190J	**Côte d'Ivoire**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG
193M	**Ethiopia**	C	C	C	C
204X	**Côte d'Ivoire**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG
209C	**Côte d'Ivoire**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG
218L	**Nigeria**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG
220N	**Morocco**	B	B	B	B
221O	**Morocco**	B	B	B	B
230X	**Nigeria**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG
256G	**Morocco**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG
261L	**Nigeria**	02_AG	A1,G	02_AG	02_AG

Tabella 16. Valutazione dei clade virali infettanti la coorte di pazienti Africani. Sono riportati in tabella i risultati ottenuti dai 4 database utilizzati per l'analisi delle sequenze della regione p6/p7 gag. In azzurro sono evidenziati i campioni con risposta IgG anti-Tat "cross-clade reattiva".

CAPITOLO 4

Discussione

Nel presente lavoro di tesi è stata studiata la proteina regolatoria Tat di HIV-1 come "bersaglio" della risposta immunitaria da parte dell'organismo ospite. Notoriamente Tat è coinvolta a diversi livelli della patologia: essenziale nella replicazione virale, nella diffusione del virus e in diversi processi responsabili dello sviluppo della malattia conclamata (AIDS) e di patologie ad essa associate [57, 59, 72-74, 77]. Abbiamo analizzato la risposta anticorpale anti-Tat e la potenziale influenza di questa sull'infezione virale, correlandola allo stato immunologico dell'ospite (conta linfocitaria T CD4+), al grado di replicazione virale (viremia plasmatica) e alla persistenza dell'infezione valutata mediante quantificazione del DNA virale cellulare, che fornisce una stima delle cellule infettate e dello stato del reservoir virale, da cui possono essere rilasciati virioni infettanti [141, 142].

Alla luce della variabilità genetica del virus HIV-1 e delle differenti caratteristiche biologiche dei diversi sottotipi virali, la valutazione della risposta anticorpale Tat specifica ha interessato la proteina Tat di HIV-1 clade B, molto rappresentato in Europa e quindi anche in Italia [98], e la proteina regolatoria del sottotipo C, in particolare le due varianti note che differiscono per l'assetto cisteinico (C30S31 C-Tat e C30C31 C-Tat). Il clade virale C è responsabile della maggior parte delle infezioni registrate a livello mondiale e la sua presenza in regioni dell'Africa con elevato tasso d'infezione è fortemente significativa [98].

Come primo step del lavoro sperimentale è stato necessario produrre in formato ricombinante la proteina C30C31 C-Tat. Il processo di produzione si è dimostrato efficiente, permettendo il recupero della proteina nella frazione solubile dell'estratto batterico (fig.12), da cui è stato possibile purificarla (fig.15).

Nella fase di caratterizzazione della proteina sono stati identificati multimeri ad alto peso molecolare rispetto alla forma monomerica di 20.1 kDa (fig.18), probabilmente costituiti da interazioni elettrostatiche, interazioni coinvolgenti ioni metallici e da ponti di solfuro, così come viene suggerito dal lavoro di Pierleoni et al. [67].

La proteina C30C31 C-Tat presenta inoltre, in condizioni native, una buona reattività con l'anticorpo policlonale Tat specifico, similmente alla proteina ricombinante B-Tat (fig.21 A); evidentemente l'analogo assetto cisteinico delle due ne permette un comportamento strutturale analogo. Al contempo, è stata evidenziata una reattività più bassa dell'anticorpo monoclonale, specifico per la regione N-terminale aa 1-20, per la C30C31 C-Tat così come per la C30S31 C-Tat rispetto alla B-Tat (fig.21 B), spiegabile dalla presenza dell'Asparagina in posizione 7 e 12 (fig.16), in sostituzione di Lisina e Arginina, probabilmente con alterazione dell'epitopo con conseguente ridotta immunoreattività del dominio N-terminale [61].

Come secondo step, la sperimentazione è proseguita con lo sviluppo e l'ottimizzazione di tre saggi immunoenzimatici, basati su metodica ELISA indiretta, necessari per la rilevazione di IgG reattive verso i tre antigeni Tat presi in esame.

Il percorso di messa a punto dei saggi ha incluso la creazione e la caratterizzazione di un controllo positivo peculiare, con potere infettivo nullo, riproducibile per quanto riguarda il processo produttivo, funzionale e stabile, molto importante per verificare la funzionalità del sistema immunoenzimatico (fig.23, 24, 25 e 26). Data la reattività più bassa del controllo positivo sulla proteina C30S31 C-Tat, si è deciso di utilizzarlo alla diluizione 1:10 (v/v) al fine di avere una buona prestazione del segnale rispetto a tutte e tre le varianti di Tat. Sono stati stabiliti i seguenti valori di accettabilità dello standard: Abs ≥1.06 - 0.370 - 0.730 per la B-Tat, C30S31 C-Tat e C30C31 C-Tat, rispettivamente (tab.1).

Gli esperimenti di messa a punto ci hanno permesso di definire i valori di riferimento del controllo negativo e del background e quindi determinare i "range" di calibrazione necessari per definire validi i saggi (tab.11, 12 e 13).

Dopo aver standardizzato le condizioni dei test sono stati esaminati 77 campioni sieronegativi. L'elaborazione dei segnali ottenuti per i tre antigeni Tat ci hanno permesso di stabilire i valori di cut-off utili per discriminare soggetti con IgG anti-Tat "detectable" da quelli con IgG anti-Tat "undetectable" (tab.3, 5 e 7).

A questo punto sono stati sottoposti ad analisi ELISA 102 campioni derivanti da soggetti sieropositivi, che hanno contratto l'infezione in Italia. In 26 pazienti è stata evidenziata una risposta IgG anti-Tat clade B al di sopra del cut off, rappresentando il 25.5% di tutta la coorte (fig.27). Situazione che rispecchia quanto descritto in letteratura, dove si parla di una ridotta percentuale di soggetti HIV-1 positivi in grado di sviluppare una risposta anti-Tat specifica, che si attesta attorno al 20% [95, 97, 143, 144]. L'individuazione dei due gruppi, "detectable" e "undetectable" per la risposta IgG anti B-Tat nella coorte di sieropositivi, ha portato ad un'analisi ulteriore confrontando i livelli di infezione tra i due gruppi che è stata monitorata tramite parametri quali: condizioni immunologiche (conta di linfociti T CD4+ circolanti) e attività del virus (viremia plasmatica e presenza di HIV DNA cellulare).

Non sono state delineate differenze importanti circa il quadro d'infezione tra i due gruppi di sieropositivi (fig.28). L'ampia variabilità di condizioni cliniche presentatisi all'interno della coorte di pazienti, ha rappresentato un presupposto importante alla stratificazione della coorte secondo le diverse condizioni cliniche, seguita poi dalle valutazioni di confronto tra IgG "detectable" e "undetectable".

Queste valutazioni hanno messo in evidenza che i sieropositivi con anticorpi anti-Tat, seppure nelle diverse situazioni cliniche, hanno una presenza numerica significativa di cellule T CD4+ in circolo rispetto ai pazienti "undetectable", associata ad un'attività replicativa del virus più controllata, così come ad una persistenza dell'infezione in forma più attenuata (fig.29, 30, 31 e 32).

Se da un lato tali risultati suggeriscono uno stato infettivo maggiormente sotto controllo in presenza della risposta anticorpale anti-Tat con un possibile effetto inibitorio degli anticorpi sulla progressione dell'infezione e protezione dal depauperamento del sistema immunitario, tuttavia un aspetto interessante che

emerge ulteriormente è che la presenza di anticorpi Tat specifici, oltre certi livelli, non sembra essere sempre prerogativa di uno stato clinico favorevole.

Infatti è stato identificato un subset di pazienti con alto titolo anticorpale anti B-Tat (>200) e anticorpi che manifestano alta cross-clade reattività verso le due varianti della proteina Tat clade C (fig.35), in questi pazienti si evidenzia maggiore attività virale (il 47% dei pazienti non presenta una viremia soppressa e la carica di HIV DNA cellulare si presenta più alta) e la conta linfocitaria è più bassa (fig.37), differentemente dai sieropositivi con IgG anti B-Tat a basso titolo (titolo ≤200) dove lo studio della cross-clade reattività degli anticorpi sulle varianti C-Tat ha evidenziato anche una moderata cross-clade reattività delle immunoglobuline (fig.36).

Questo ci porta a pensare che una situazione di elevata attività virale potrebbe creare le condizioni di una stimolazione intensiva del sistema immunitario che può portare ad una massiva risposta policlonale con produzione di alte quantità di IgG anti-Tat, caratterizzata da immunoglobuline non protettive. Tesi che sembrerebbe essere sostenuta da quanto osservato nei sieropositivi ad alto titolo e alta cross-clade reattività, questi pazienti sembrano presentare anticorpi circolanti scarsamente reattivi per la regione N-terminale della proteina Tat rispetto a quanto evidenziato nei soggetti con risposta anticorpale moderata (fig.39 B). È noto infatti che il dominio N-terminale è necessario per l'attività di transattivazione e per l'uptake cellulare della proteina [62, 138, 139].

In condizioni di intensa replicazione virale si possono determinare alti livelli di espressione della proteina Tat, la quale ha una forte tendenza a formare oligomeri inattivi che possono mascherare gli epitopi agli anticorpi anti-Tat neutralizzanti [138]. Ossia, la formazione di oligomeri potrebbe incidere sulla conformazione della proteina virale con alterazioni dell'esposizione di epitopi immunoreattivi funzionalmente importanti, con ripercussioni sulla possibilità di stimolazione di una risposta anticorpale protettiva.

I risultati finora mostrati mettono in luce la complessità e la variabilità che sussistono in relazione all'infezione da HIV-1, soprattutto relativamente alla risposta anticorpale

anti-Tat. Postulati messi in luce anche dalle considerazioni fatte studiando la coorte di pazienti sieropositivi provenienti dall'Africa.

Dopo valutazioni della presenza e cross-clade reattività degli anticorpi Tat clade B e C30S31/C30C31 Tat clade C specifici, sono stati individuati 6 pazienti della coorte Africana con una risposta anticorpale "cross-clade reattiva" e 13 sieropositivi presentanti una risposta anticorpale "no cross-clade reattiva", dove le IgG anti-Tat circolanti mostrano reattività per almeno una delle due varianti clade C e nessuna per la B-Tat (fig.40). Tra l'altro, è da sottolineare un diverso riconoscimento delle due varianti C-Tat da parte degli anticorpi (fig.41 e 42): la presenza della Cisteina in posizione 31 potrebbe incidere su differenze conformazionali della proteina, si riporta infatti che tale amminoacido è legato ad una maggiore flessibilità strutturale [67], con esposizione di epitopi differentemente riconosciuti dagli anticorpi circolanti.

Confrontando i livelli di infezione tra i due gruppi di pazienti Africani, i sieropositivi con risposta anticorpale "cross-clade reattiva" sembrano presentare uno stato clinico maggiormente positivo rispetto a quelli con risposta "no cross-clade reattiva" (fig.43).

Nella risposta "cross-clade reattiva", le IgG anti B-Tat sembrano assolvere un ruolo protettivo a differenza delle immunoglobuline reattive verso le varianti C-Tat, la cui presenza non sembra aver alcuna influenza sui livelli di infezione (fig.44, 45 e 46).

Inoltre, la risposta "cross-clade reattiva" appare costituita soprattutto da immunoglobuline che riconoscono la regione N-terminale della proteina Tat rispetto alla risposta "no cross-clade reattiva", dove risultano essere maggiormente reattive rispetto alla regione basica di Tat (fig.47 e 48).

I pazienti Africani sono stati oggetto di identificazione del sottotipo virale infettante; dai risultati ottenuti abbiamo constatato che i sieropositivi presentanti la risposta anticorpale anti-Tat "cross-clade reattiva" erano stati infettati dal sottotipo virale B e dalla forma ricombinante CRF 02_AG, per i soggetti invece con una risposta anticorpale caratterizzata da immunoglobuline reattive per la Tat clade C (per entrambe o per una delle due varianti) abbiamo identificato come sottotipo infettante il clade G, A, CRF 02_AG e la forma ricombinante CD (tab.16).

Di fronte alla variabilità genetica del virus HIV-1, i risultati ottenuti dall'analisi della coorte di sieropositivi infettatisi in Africa ci hanno portato a riflettere sulle variazioni che possono interessare la proteina Tat dei diversi sottotipi virali.

Le variazioni della struttura primaria possono portare a cambiamenti del potere immunogenico di Tat e dell'esposizione di epitopi immunodominanti nelle varianti della proteina regolatoria con influenza sul tipo di risposta anticorpale indotta, caratterizzata da immunoglobuline protettive contrastanti l'azione della proteina e, al contempo, capaci di "cross-clade recognition", dove la presenza di anticorpi in grado di riconoscere Tat del sottotipo virale B sembra essere importante per l'effetto protettivo.

Questi risultati sembrano far emergere una condizione di "clade-specificità" circa la possibilità di stimolazione di una risposta Tat specifica "cross-clade reattiva" e, in modo particolare, protettiva, legata alla forma ricombinante CRF 02_AG ma, soprattutto, al sottotipo virale B e no al clade G, A, CD e alla stessa CRF 02_AG.

Considerazioni queste che rappresentano un punto importante di riflessione in relazione all'utilizzo di un vaccino HIV/AIDS basato sulla proteina Tat, nonché al tipo di antigene immunizzante da impiegare. In merito a ciò, un recente lavoro sostiene la proteina Tat clade B ai fini dell'immunizzazione per la capacità di indurre anticorpi "cross-clade neutralizzanti" [145].

Dal nostro studio osservazionale abbiamo potuto constatare una complessità e variabilità di comportamento della proteina Tat come target del sistema immunitario dell'ospite in relazione alle diverse condizioni cliniche che si possono presentare nell'infezione virale, nonché di fronte alla diversità dei sottotipi del virus HIV-1.

Nonostante la fase di sperimentazione ha avuto dei limiti rappresentati soprattutto dal sistema casuale di reclutamento dei pazienti e dalla conseguente ampia variabilità di condizioni cliniche presentatisi, così come dal contenuto numero di soggetti avuto a disposizione, tutto lo studio ci suggerisce la necessità di approfondimenti di conoscenza sulla proteina regolatoria e sulla risposta anticorpale da essa stimolata.

È importante indagare ancora sulle differenze tra i clade e le forme ricombinanti virali circolanti, rispetto ai quali è sempre più importante valutare l'impatto della variabilità genetica sulle condizioni cliniche e sulle risposte terapeutiche [99, 100]. Importante non solo per il significato clinico che queste informazioni ricoprono ma anche per i continui flussi migratori, che portano in Italia e in Europa un aumento di forme ricombinanti del virus.

Tutto lo studio andrebbe maggiormente approfondito, prendendo in considerazione B-Tat come potenziale antigene vaccinale per HIV/AIDS e facendo uno screening prima dell'applicazione del protocollo vaccinale, al fine di evidenziare in pazienti eleggibili la risposta anti-Tat che il paziente ha sviluppato per valutarne la capacità neutralizzante.

I test messi a punto durante questo studio potrebbero fornire un valido aiuto se usati come mezzo di screening della risposta anti-Tat.

BIBLIOGRAFIA

[1] http://www.aids.gov/hiv-aids-basic/hiv-aids-101/aids-timeline.html

[2] Barré-Sinoussi F., Cherman J. C , Rey F , Nugeyre M. T., Charmeret S., Gruest J., Dauguet C., Axler-Blin C. et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)*. Science, 220: 868-871 (1983).

[3] Gallo R. C., Sarin P. S., Gelmann E. P., Robert-Guroff M., Richardson E., Kalyanaraman V. S., Mann D., Sidhu G. D. et al., *Isolation of human T cell leukemia virus in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)*. Science, 220: 865-867 (1983)).

[4] http://www.avert.org/professionals/history-hiv-aids/overview.html

[5] Coffin J., Haase A., Levy J. A., Montagnier L., Oroszlan S., Teich N., Temin H., Toyoshima K. et al., *Human Immunodeficiency Viruses*. Science, 232 (4751):697 (1986).

[6] Clavel F., Guétard D., Brun-Vézinet F., Chamaret S., Rey M. A., Santos-Ferreira M. O., Laurent A. G., Dauguet C. et al., *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science, 233 (4761): 343-346 (1986).

[7] Gottlieb G. S., Sow P. S., Hawes S. E., Ndoye I., Redman M., Coll-Seck A. M., Faye-Niang M. A., Diop A. et al., *Equal plasma viral loads predict a similar rate of CD4^{+} T cell decline in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1- and HIV-2-infected individuals from Senegal, West Africa*. Journal of Infectious Disease, 185: 905-914 (2002).

[8] Whittle H., Morris J., Todd J., Corrah T., Sabally S., Bangali J., Ngom P. T., Rolfe M. et al., *HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients*. AIDS, 8 (11): 1617-1620 (1994).

[9] Kahn J. O. and Walker B. D., *Acute human immunodeficiency virus type 1 infection*. The New England Journal of Medicine, 339: 33-39 (1998).

[10] Hoffmann C., Rockstroch J. K. and Kamps B. S., *HIV Medicine 2007*. http://www.HIVMedicine.com

[11] Fanales-Belasio E., Raimondo M., Suligoi B. and Buttò S., *HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview*. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 46 (1): 5-14 (2010).

[12] Simon V., Ho D. D. and Karim Q. A., *HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment*. Lancet, 368 (9534): 489-504 (2006).

[13] Bangham C. R., *CTL quality and the control of human retroviral infection*. European Journal of Immunology, 39: 1700-1712 (2009).

[14] Borrow P., Lewicki H., Hahn B. H., Shaw G. M. and Oldstone M. B., *Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. Journal of Virology, 68: 6103-6110 (1994).

[15] Koup R. A., Safrit J. T., Cao Y., Andrews C. A., McLeod G., Borkowsky W., Farthing C. and Ho D. D., *Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome*. Journal of Virology, 68: 4650-4655 (1994).

[16] Yang O. O., Kalams S. A., Trocha A., Cao H., Luster A., Johnson R. P. and Walker B. D., *Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8 + cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and non cytolitic mechanism*. Journal of Virology, 71: 3120-3128 (1997).

[17] Fujiwara M., Takata H., Oka S., Tomiyama H. and Takiguchi M., *Patterns of cytokine production in human immunodeficiency virus type 1-specific human CD8+ T cells after stimulation with HIV-1 infected CD4+ T cells*. Journal of Virology, 79 (19): 12536-12543 (2005).

[18] Levy J. A., *Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. Microbiological Reviews, 57 (1): 183-289 (1993).

[19] Chung A., Rollman E., Johansson S., Kent S. J. and Stratov I., *The utility of ADCC responses in HIV infection*. Current HIV Research, 6: 515-519 (2008).

[20] Stamatatos L., Morris L., Burton D. R. and Mascola J. R., *Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine?* Nature Medicine, 15: 866-870 (2009).

[21] Ford E. S., Puronen C. E. and Sereti I., *Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm*. Current Opinion in HIV and AIDS, 4: 206-214 (2009).

[22] Pantaleo G., Graziosi C. and Demeresi J. F., *HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease*. Nature, 362: 355-359 (1993).

[23] http://www.hiv1tat-vaccines.info

[24] Brooks J. T., Kaplan J. E., Holmes K. K., Benson C., Pau A. and Masur H., *HIV-associated opportunistic infections-going, going, but not gone: the continued need for prevention and treatment*. Clinical Infectious Disease, 48: 609-6011 (2009).

[25] Clifford G. M. and Franceschini S., *Cancer risk in HIV-infected persons: influence of CD4+ count*. Future Oncology, 5: 669-698 (2009).

[26] *AIDS by the numbers 2015*. http://www.unaids.org

[27] http://www.who.int

[28] Sundquist W. I. and Kräusslich H. G., *HIV-1 assembly, budding, and maturation*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2(7):a006924 (2012).

[29] Freed E. O., *HIV-1 replication*. Somatic Cell and Molecular Genetics, 26 (1-6): 13-33 (2001).

[30] Poli G., Cocuzza G. and Nicoletti G., *Microbiologia medica*. UTET editore: 589-590; 592-595 (1993).

[31] http://www.naid.nih.gov

[32] Rajarapu G., *Genes and Genome of HIV-1*. Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology, 2 (1):1000126 (2014).

[33] Buonaguro L., Buonaguro F. M., Giraldo G. and Ensoli B., *The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein transactivates Tumor Necrosis Factor Beta gene expression through a TAR-like structure*. Journal of Virology, 68 (4): 2677-2682 (1994).

[34] Berkhout B., *Structure and function of the human immunodeficiency virus leader RNA*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 54**:** 1-34 (1996).

[35] Das A. T., Klaver B. and Berkhout B., *A hairpin structure in the R region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is instrumental in polyadenylation site selection*. Journal of Virology, 73 (1): 81-91 (1999).

[36] Damgaard C. K., Andersen E. S., Knudsen B., Gorodkin J. and Kjems J., *RNA interactions in the 5' region of the HIV-1 genome*. Journal of Molecular Biology, 336: 369-379 (2004).

[37] Sükösd Z., Andersen E. S., Seemann S. E., Jensen M. K., Hansen M., Gorodkin J. and Kjem J., *Full-length RNA structure prediction of the HIV-1 genome reveals a conserved core domain*. Nucleic Acids Research, doi:10.1093/nar/gkv1039 (2015).

[38] Arien K. K. and Verhasselt B., *HIV nef: Role in pathogenesis and viral fitness*. Current HIV Research, 6: 200-208 (2008).

[39] Neri F., Giolo G., Potestà M., Petrini S. and Doria M., *The HIV-1 Nef protein has a dual role in T cell receptor signaling in infected $CD4^+$T lymphocytes*. Virology, 410: 316-326 (2011).

[40] Abraham L. and Fackler O. T., *HIV-1 Nef: a multifaceted modulator of T cell receptor signaling*. Cell Communication and Signaling, 10:39 (2012).

[41] Heinzinger N. K., Bukinsky M. I., Haggerty S. A., Ragland A. M., Kewalramani V., Lee M. A., Gendelman H. E., Ratner L. et al., *The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 91: 7311-7315 (1994).

[42] Subbramanian R. A., Kessous-Elbaz A., Lodge R., Forget J., Yao X. J., Bergeron D. and Cohen E. A., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages*. The Journal of Experimental Medicine, 187: 1103-1111 (1998).

[43] Vodicka M. A., Koepp D. M., Silver P. A. and Emerman M., *HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection*. Genes & Development, 12: 175-185 (1998).

[44] Herbein G., Gras G., Khan K. A. and Abbas W., *Macrophage signaling in HIV-1 infection*. Retrovirology,7:34 (2010).

[45] Davis M. R., Jiang J., Zhou J., Freed E. O. and Aiken C., *A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein destabilizes the interaction of the envelope protein subunits gp120 and gp41*. Journal of Virology, 80 (5): 2405-2417 (2006).

[46] Ensoli B., Nappi F., Ferrantelli F. and Buttò S., *Retrovirus*. EMI, vol. XIII, coll. 1113-1119; Ag. I coll. 6404-6420; Ag. II coll. 5085-5089 (2008).

[47] Doms R. W. and Moore J. P., *HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity*. The Journal of Cell Biology, 151: F9-F13 (2000).

[48] Coffin J. M., Hughes S. H. and Varmus H. E., *Outline of the Integration Process*. Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997).

[49] Jayappa K. D., Ao Z. and Yao X., *The HIV-1 passage from cytoplasm to nucleus: the process involving a complex exchange between the components of HIV-1 and cellular machinery to access nucleus and successful integration*. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 3 (1): 70-85 (2012).

[50] Persaud D., Pierson T., Ruff C., Finzi D., Chadwick K. R., Margolick J. B., Ruff A., Hutton N. et al., *A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T lymphocytes in infected children*. The Journal of Clinical Investigation, 105 (7): 995-1003 (2000).

[51] Alexaki A., Liun Y. and Wigdahl B., *Cellular reservoir of HIV-1 and their role in viral persistence*. Current HIV Research, 6 (5): 388-400 (2008).

[52] Siliciano R. F. and Greene W. C., *HIV latency*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 1 (1):a007096 (2011).

[53] Van Lint C., Bouchat S. and Marcello A., *HIV-1 trascription and latency: an update*. Retrovirology, 10:67 (2013).

[54] Kumar A., Abbas W. and Herbein G., *HIV-1 latency in monocytes/macrophages*. Viruses, 6: 1837-1860 (2014).

[55] Pierson T., McArthur J. and Siliciano R. F., *Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy*. Annual Reviews of Immunology, 18: 665-708 (2000).

[56] Bohan C. A., Kashanchi F., Ensoli B., Buonaguro L., Boris-Lawrie K. A. and Brady J. N., *Analysis of Tat transactivation of human immunodeficiency virus transcription in vitro*. Gene Expression, 2 (4): 391-407 (1992).

[57] Watson K. and Edwards R. J., *HIV-1 trans-activating (Tat) protein*. Biochemical Pharmacology, 58: 1521-1528 (1999).

[58] Kaplank H. A., Manchester M. and Swanstrom R., *The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency*. Journal of Virology, 68 (10): 6782-6786 (1994).

[59] Chang H. K., Gallo R. C. and Ensoli B., *Regulation of cellular gene expression and function by the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein*. Journal of Biomedical Science, 2: 189-202 (1995).

[60] Moreau E., Belliard G., Partidos C. D., Pradezinsky F., Le Buanec H., Muller S. and Desgranges C., *Important B-cell epitopes for neutralization of human immunodeficiency virus type 1 Tat in serum samples of humans and different animal species immunized with Tat protein or peptides*. Journal of General Virology, 85: 2893-2901 (2004).

[61] Ruckwardt T. J., Tikhonov I., Berg S., Hatfield G. S., Chandra A., Chandra P., Gilliam B., Redfield R. R. et al., *Sequence variation within the dominant amino terminus epitope affects antibody binding and neutralization of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein*. Journal of Virology, 78 (23): 13190-13196 (2004).

[62] Reddy M. V. R., Desai M., Jeyapaul J., Prasad D. D. K., Seshamma T., Palmeri D. and Khan S. A., *Functional analysis of the N-terminal of Tat protein of the human immunodeficiency virus type 1*. Oncogene, 7: 1743-1748 (1992).

[63] Frankel A. D., Bredt D. S. and Pabo C. O., *Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer*. Science, 240 (4848): 70-73 (1988).

[64] Frankel A. D., Chen L., Cotter R. J. and Pabo C. O., *Dimerization of the tat protein from human immunodeficiency virus: a cysteine-rich peptide mimics the normal metal-linked dimer interface*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 85: 6297-6300 (1988).

[65] Garber M. E., Wei P., KewalRamani V. N., Mayall T. P., Herrmann C. H., Rice A. P., Littman D. R. and Jones K. A., *The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein*. Genes and Development, 12: 3512-3525 (1998).

[66] Tahirov T. H., Babayeva N. D., Varzavand K., Cooper J. J., Sedore S. C. and Price D. H., *Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb*. Nature, 465: 747-751 (2010).

[67] Pierleoni R., Menotta M., Antonelli A., Sfara C., Serafini G., Dominici S., Laguardia M. E., Salis A. et al., *Effect of the redox state on HIV-1 tat protein multimerization and cell internalization and trafficking*. Molecular and Cellular Biochemistry, 345: 105-118 (2010).

[68] Debaisieux S., Rayne F., Yezid H. and Beaumelle B., *The Ins and Out of HIV-1 Tat*. Traffic, 13: 355-363 (2012).

[69] Jeang K. T., *HIV-1 Tat: Structure and Function*. http://www.hiv.lanl.gov/CONTENT/SEQUENCE/HIV/COMPENDIUM

[70] Karn J., *Tat, a novel regulator of HIV transcription and latency*. http://www.hiv.lanl.gov/CONTENT/SEQUENCE/HIV/REVIEWS

[71] Das A. T., Harwing A. and Berkhout B., *The HIV-1 Tat protein has a versatile role in activating viral transcription*. Journal of Virology, 85 (18): 9506-9516 (2011).

[72] Romani B., Engelbrecht S. and Glashoff R. H., *Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1*. Journal of General Virology, 91: 1-12 (2010).

[73] Rusnati M. and Presta M., *HIV-1 Tat protein. A target for the development of anti-AIDS therapies*. Drugs of the Future, 27 (5): 481-493 (2002).

[74] Marchiò S., Alfano M., Primo L., Gramaglia D., Butini L., Gennero L., De Vivo E., Arap W. et al., *Cell surface-associated Tat protein modulates HIV-1 infection and spreading through a specific interaction with gp120 viral envelope protein*. Blood, 105: 2802-2811 (2005).

[75] Tyagi M., Rusnati M., Presta M. and Giacca M., *Internalization of HIV-1 Tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans*. The Journal of Biological Chemistry, 276 (5): 3254-3261 (2001).

[76] Fanales-Belasio E., Moretti S., Nappi F., Barillari G., Micheletti F., Cafaro A. and Ensoli B., *Native HIV-1 Tat protein targets monocyte-derived dendritic cells and enhances their maturation, function, and antigen-specific T cell responses*. The Journal of Immunology, 168: 197-206 (2002).

[77] Buonaguro L., Barillari G., Chang H. K., Bohan C. A., Kao V., Morgan R., Gallo R. C. and Ensoli B., *Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines*. Journal of Virology, 66 (12): 7159-7167 (1992).

[78] Ju S. M., Song H. Y., Lee J. A., Lee S. J., Choi S. Y. and Park J., *Extracellular HIV-1 Tat up-regulates expression of matrix metalloproteinase-9 via MAPK-NF-kB dependent pathway in human astrocytes*. Experimental and Molecular Medicine, 41 (2): 86-93 (2009).

[79] Benelli R., Mortarini R., Anichini A., Giunciuglio D., Noonan D. M., Montalti S., Tacchetti C. and Albini A., *Monocyte-derived dendritic cells and monocytes migrate to HIV-Tat RGD and basic peptides*. AIDS, 12: 261-268 (1998).

[80] Barillari G., Sgadari C., Palladino C., Gendelman R., Caputo A., Morris C. B., Nair B. C., Markham P. et al., *Inflammatory cytokines synergize with the HIV-1 Tat protein to promote angiogenesis and Kaposi's Sarcoma via induction of basic Fibroblast Growth Factor and the $\alpha_V\beta_3$ integrin*. The Journal of Immunology, 163: 1929-1935 (1999).

[81] Barillari G. and Ensoli B., *Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's Sarcoma*. Clinical Microbiology Reviews, 15 (2): 310-326 (2002).

[82] Toschi E., Bacigalupo I., Strippoli R., Chiozzini C., Cereseto A., Falchi N., Nappi F., Sgadari C. et al., *HIV-1 Tat regulates endothelial cell cycle progression via activation of the Ras/ERK MAPK signaling pathway*. Molecular Biology of the Cell, 17: 1985-1999 (2006).

[83] Poggi A., Carosio R., Spaggiari G. M., Fortis C., Tambussi G., Dell'Antonio G., Dal Cin E., Rubartelli A. et al., *NK cell activation by dendritic cells is dependent on LFA-1-mediated induction of calcium-calmodulin kinase II: inhibition by HIV-1 Tat C-terminal domain*. The Journal of Immunology, 168: 95-101 (2002).

[84] Liu Y., Cong Y. and Shao Y., *HIV Tat regulates the immune responses induced by vaccines*. British Journal of Virology, 1 (2): 64-71 (2014).

[85] Kwon H. S., Brent M. M., Getachew R., Jayakumar P., Chen L. F., Schnolzer M., McBurney M. W., Marmorstein R. et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein inhibits the SIRT1 deacetylase and induces T-cell hyperactivation*. Cell Host Microbe, 3 (3): 158-167 (2008).

[86] Leonard R., Zagury D., Desportes I., Bernard J., Zagury J. F. and Gallo R. C., *Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 85: 3570-3574 (1988).

[87] Costin J. M., *Cytopathic mechanisms of HIV-1*. Virology Journal, 4:100 (2007).

[88] Paiardini M., Cervasi B., Dunham R., Sumpter B., Radziewicz H. and Silvestri G., *Cell-Cycle dysregulation in the immunopathogenesis of AIDS*. Immunologic Research, 29 (1-3): 253-267 (2004).

[89] Fanales-Belasio E., Moretti S., Fiorelli V., Tripiciano A., Pavone Cossut M. R., Scoglio A., Collacchi B., Caputo A. et al., *HIV-1 Tat addresses dendritic cells to induce a predominant Th1-type immune response that appears prevalent in the asymptomatic stage of infection*. The Journal of Immunology, 182: 2888-2897 (2009).

[90] Nicoli F., Finessi V., Sicurella M., Rizzotto L., Gallerani E., Destro F., Cafaro A., Marconi P. et al., *The HIV-1 Tat protein induces the activation of $CD8^+$ T cells and affects in vivo the magnitude and kinetics of antiviral responses*. Plos ONE, 8 (11):e77746 (2013).

[91] Re M. C., Furlini G., Vignoli M., Ramazzotti E., Roderigo G., De Rosa V., Zauli G., Lolli S. et al., *Effect of antibody to HIV-1 Tat protein replication in vitro and progression of HIV-1 disease in vivo*. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome and Human Retrovirology, 10: 408-416 (1995).

[92] Re M. C., Furlini G., Vignoli M., Ramazzotti E., Zauli G. and La Placa M., *Antibody against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Tat protein may*

have influenced the progression of AIDS in HIV-1-infected hemophiliac patients. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 3 (2): 230-232 (1996).

[93] Re M. C., Vignoli M., Furlini G., Gibellini D., Colangeli V., Vitone F. and La Placa M., *Antibodies against full-length Tat protein and some low-molecular-weight Tat-peptides correlate with low or undetectable viral load in HIV-1 seropositive patients*. Journal of Clinical Virology, 21: 81-89 (2001).

[94] Rezza G., Fiorelli V., Dorrucci M., Ciccozzi M., Tripiciano A., Scoglio A., Collacchi B., Ruiz-Alvarez M. et al., *The presence of anti-Tat antibodies is predective of long-term nonprogression to AIDS or severe immunodeficiency: findings in a cohort of HIV-1 seroconverters*. The Journal of Infectious Diseases, 191: 1321-1324 (2005).

[95] Bellino S., Tripiciano A., Picconi O., Francavilla V., Longo O., Sgadari C., Paniccia G., Arancio A. et al., *The presence of anti-Tat antibodies in HIV-infected individuals is associated with containment of $CD4^+$ T-cell decay and viral load, and with delay of disease progression: results of a 3-years cohort study*. Retrovirology, 11:49 (2014).

[96] Ensoli B., Fiorelli V., Ensoli F., Cafaro A., Titti F., Buttò S., Monini P., Magnani M. et al., *Candidate HIV-1 tat vaccine development: from basic science to clinical trials*. AIDS, 20: 2245-2261 (2006).

[97] Caputo A., Gavioli R., Bellino S., Longo O., Tripiciano A., Francavilla V., Sgadari C., Paniccia G. et al., *HIV-1 Tat-based vaccines: an overview and perspectives in the field of HIV/AIDS vaccine development*. International Reviews of Immunology, 28: 285-334 (2009).

[98] Buonaguro L., Tornesello M. L. and Buonaguro F. M., *Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications*. Journal of Virology, 81 (19): 10209-10219 (2007).

[99] Santoro M. M. and Perno C. F., *HIV-1 genetic variability and clinical implications*. ISRN Microbiology, Article ID 481314 (2013).

[100] Spira S., Wainberg M. A., Loemba H., Turner D. and Brenner B. G., *Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51 : 229-240 (2003).

[101] Castro-Nallar E., Crandall K. A. and Pérez-Losada M., *Genetic diversity and molecular epidemiology of HIV transmission*. Future Virology, 7 (3): 239-252 (2012).

[102] http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html

[103] http://www.avert.org/hiv-types.html

[104] Roy C. N., Khandaker I., Furuse Y. and Oshitani H., *Molecular characterization of full-length Tat in HIV-1 subtype B and C*. Bioinformation, 11 (3): 151-160 (2015).

[105] http://www.bioafrica.net/proteomics/TATprot.html

[106] Mokizuki N., Otsuka N., Matsuo K., Shiino T., Kojima A, Kurata T, Sakai K, Yamamoto N et al., *An infectious DNA clone of HIV type 1 subtype C*. AIDS Research and Human Retroviruses, 15 (14): 1321-1324 (1999).

[107] Novitsky V. A., Montano M. A., McLane M. F., Renjifo B., Vannberg F., Foley B. T., Ndung'u T. P. et al., *Molecular cloning and phylogenetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C: a set of 23 full-length clones from Botswana*. Journal of Virology, 73: 4427-4432 (1999).

[108] Kandathil A. J., Kannangai R., Abraham O. C., Pulimood S. A. and Sridharan G., *Amino acid sequence divergence of Tat protein (exon1) of subtype B and C HIV-1 strains: development it have implications for vaccine development?* Bioinformation, 4 (6): 237-241 (2009).

[109] Mishra M., Vetrivel S., Siddappa N. B., Ranga U. and Seth P., *Clade-specific differences in neurotoxicity of human immunodeficiency virus-1 B and C Tat of human neurons: significance of dicysteine C30C31 motif*. Annals of Neurology, 63: 366-376 (2008).

[110] Samikkanu T., Rao K. V. K., Kanthikeel S. P., Atluri V. S. R., Agudelo M., Roy U. and Nair M. P. N., *Immunoneuropathogenesis of HIV-1 clades B and C:*

role of redox expression and thiol modification. Free Radical Biology and Medicine, 69: 136-144 (2014).

[111] Paul R. H., Joska J. A., Woods C., Seedat S., Engelbrecht S., Hoare J., Heaps J., Valcour V. et al., *Impact of the HIV Tat C30C31S dicysteine substitution on neuropsychological function in patients with clade C disease*. Journal of Neuro Virology. 20: 627-635 (2014).

[112] Ranga U., Shankarappa R., Siddappa N. B., Ramakrishna L., Nagendran R., Mahalingam M., Mahadevan A., Jayasuryan N. et al., *Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 subtype C strains is a defective chemokine*. Journal of Virology, 78 (5): 2586-2590 (2004).

[113] Rao V. R., Neogi U., Talboom J. S., Padilla L., Rahman M., Fritz-French C., Gonzalez-Ramirez S., Verma A. et al., *Clade C HIV-1 isolates circulating in Southern Africa exhibit a greater frequency of dicysteine motif-containing Tat variants than those in Southeast Asia and cause increased neurovirulence*. Retrovirology, 10:61 (2013).

[114] Kurosu T., Mukai T., Komoto S., Ibrahim M. S., Li Y. G., Kobayashi T., Tsuji S. and Ikuta K., *Human immunodeficiency virus type 1 subtype C exhibits higher transactivation activity of Tat than subtype B* and E. Microbiology and Immunology, 46 (11): 787-799 (2002).

[115] Sood V., Ranjan R. and Banerjea A. C., *Functional analysis of HIV-1 subtypes B and C HIV-1 Tat exons and RGD/QGD motifs with respect to Tat-mediated transactivation and apoptosis*. AIDS, 22: 1683-1698 (2008).

[116] Katzenstein T. L., Oliveri R. S., Benfield T., Eugen-Olsen J., Nielsen C., Gerstoft J. and *Copenhagen AIDS Cohort Study Group, Cell-associated HIV DNA measured early during infection has prognostic value indipendent of serum HIV RNA measured concomitantly*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 34: 529-533 (2002).

[117] Kostrikis L. G., Touloumi G., Karanicolas R., Pantazis N., Anastassopoulou C., Karafoulidou A., Goedert J. J., Hatzakis A. et al., *Quantification of human*

immunodeficiency virus type 1 DNA forms with the second template switch in peripheral blood cells predicts disease progression independently of plasma RNA load. Journal of Virology, 76: 10099-10108 (2002).

[118] Parisi S. G., Andreis S., Mengoli C., Scaggiante R., Ferretto R., Manfrin V., Cruciani M., Giobba M. et al., *Baseline cellular HIV DNA load predicts HIV DNA decline and residual HIV plasma levels during effective antiretroviral therapy*. Journal of Clinical Microbiology, 50 (2): 258-263 (2012).

[119] Williams J. P., Hurst J., Stöhr W., Robinson N., Brown H., Fisher M., Kinloch S., Cooper D. et al., *HIV-1 DNA predicts disease progression and post-treatment virological control*. eLife, 3:e03821 (2014).

[120] Schüpbach J., Tomasik Z., Knuchel M., Opravil M., Günthard H. F., Nadal D., Böni J., the Swiss HIV Cohort Study (SHCS) et al., *Optimized virus disruption improves detection of HIV-1 p24 in particles and uncovers a p24 reactivity in patients with undetectable HIV-1 RNA under long-term HAART*. Journal of Medical Virology, 78: 1003-1010 (2006).

[121] Bradford M. M., *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 72: 248-254 (1976).

[122] Valvatne H., Szilvay A. M. and Helland D. E., *A monoclonal antibody defines a novel HIV type 1 Tat domain involved in trans-cellular trans-activation*. AIDS Research and Human Retroviruses, 12 (7): 611-619 (1996).

[123] Kapoor M., *How to cross-link proteins*. http://www.fgnc.net/neurosporaprotocols

[124] *Guidance for Industry*. *Bioanalytical Method Validation*. http://www.fda.gov

[125] Crowther J. R., *The ELISA Guidebook*. Humana Press (2000).

[126] Nybo K., *Immunology and Immunochemistry: ELISA*. BioTechiniques, 49: 555-556 (2010).

[127] Casabianca A., Gori C., Orlandi C., Forbici F., Perno C. F. and Magnani M., Fast and sensitive quantitative detection of HIV DNA in whole blood leucocytes by SYBR green I real-time PCR assay. Molecular and Cellular Probes, 21: 368-378 (2007).

[128] Casabianca A., Orlandi C., Canovari B., Scotti M., Acetoso M., Valentini M., Petrelli E. and Magnani M., *A Real Time PCR platform for the simultaneous quantification of total and extrachromosomal HIV DNA forms in blood of HIV-1 infected patients*. Plos ONE, 9:e111919 (2014).

[129] Buttò S., Fiorelli V., Tripiciano A., Ruiz-Alvarez M. J., Scoglio A., Ensoli F., Ciccozzi M., Collacchi B. et al., *Sequence conservation and antibody cross-recognition clade B human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Tat protein in HIV-1-infected Italians, Ugandans, and South Africans*. The Journal of Infectious Diseases, 188: 1171-1180 (2003).

[130] Gaschen B., Kuiken C., Korber B. and Foley B., *Retrieval and on-the-fly alignment of sequence fragments from the HIV database*. BIOINFORMATICS, 17 (5): 415-418 (2001).

[131] Struck D., Lawyer G., Ternes A. M., Schmit J. C. and Perez Bercoff D., *COMET: adaptative context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification*. Nucleic Acids Research, 42 (18):e144 (2014).

[132] Zhang M., Schultz A. K., Calef C., Kuiken C., Leitner T., Korber B., Morgenstern B. and Stanke M., *jpHMM at GOBICS: a web server to detect genomic recombinations in HIV-1*. Nucleic Acids Research, 34 (Web Server Issue): W463-W465 (2006).

[133] Schultz A. K., Zhang M., Leitner T., Kuiken C., Korber B., Morgenstern B. and Stanke M., *A jumping profile Hidden Markov Model and applications to recombination sites in HIV and HCV genomes*. BMC Bioinformatics, 7:265 (2006).

[134] Rozanov M., Plikat U., Chappey C., Kochergin A. and Tatusova T., *A web-based genotyping resource for viral sequences*. Nucleic Acids Research, 32 (Web Server Issue): W654-W659 (2004).

[135] Hoffmann C. and Rockstroch J. K., *HIV 2015/16*. http://www.hivbook.com

[136] http://www.aidsetc.org/guide/hiv-classification-cdc-and-who-staging-systems

[137] Rusnati M., Tulipano G., Urbinati C., Tanghetti E., Giuliani R., Giacca M., Ciomei M., Corallini A. et al., *The basic domain in HIV-1 Tat protein as a target for polysulfonated heparin-mimicking extracellular Tat antagonists*. The Journal of Biological Chemistry, 273 (26): 16027-16037 (1998).

[138] Tikhonov I., Ruckwardt T. J., Hatfield G. S. and Pauza C. D., *Tat-neutralizing antibodies in vaccinated macaques*. Journal of Virology, 77 (5): 3157-3166 (2003).

[139] Chaloin O., Peter J. C., Briand J. P., Masquida B., Desgranges C., Muller S. and Hoebeke J., *The N-terminus of HIV-1 Tat proteins essential for Tat-TAR RNA interaction*. Cellular and Molecular Life Sciences, 62: 355-361 (2005).

[140] http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo/geo.comp

[141] d'Ettorre G., Zaffiri L., Ceccarelli G., Mastroianni C. M. and Vullo V., *The role of HIV-DNA testing in clinical practice*. New Microbiologica, 33: 1-11 (2010).

[142] Alidjinou E. K., Bocket L. and Hober D., *Quantification of viral DNA during HIV-1 infection: A review of relevant clinical uses and laboratory methods.* Pathologie Biologie, 63: 53-59 (2015).

[143] Cafaro A., Macchia I., Maggiorella M. T., Titti F. and Ensoli B., *Innovative approaches to develop prophylactic and therapeutic vaccines against HIV/AIDS*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 655: 189-242 (2009).

[144] Chen Q., Li L., Liao W., Zhang H., Wang J., Sheng B., Zhang H., Huang X. et al., *Characterization of Tat antibody responses in Chinese individuals infected with HIV-1*. Plos ONE, 8 (4):e60825 (2013).

[145] Ensoli B., Nchabeleng M., Ensoli F., Tripiciano A., Bellino S., Picconi O., Sgadari C., Longo O. et al., *HIV-Tat immunization induces cross-clade neutralizing antibodies and CD4+ T cell increases in antiretroviral-treated South African volunteers: a randomized phase II clinical trial*. Retrovirology 13:34 (2016).