

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

**SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI**

**DIPARTIMENTO DI
SCIENZE CLINICHE L. SACCO**

**CORSO DI DOTTORATO IN
MALATTIE INFETTIVE
(XXIV CICLO)**

Identificazione di tre nuovi peptidi salivari basici ricchi di prolina
caratterizzati da attività anti- HIV-1.

MED/17

Dottoranda:
dott.ssa Paola Ronzi

Tutor:

dott. Claudio Casoli

Coordinatore del Dottorato:
Prof. Massimo Galli

A.A. 2010- 2011

NOTE

I peptidi discussi in questa tesi e tutte le eventuali applicazioni che ne derivano sono oggetto di brevetto italiano (RM2011A000035; RM2011A000036; RM2011A000037).

SOMMARIO

INTRODUZIONE

1.1	HIV: diffusione e modalità di trasmissione.	pag. 1
1.2	Incidenza dell'infezione da HIV-1 per via orale.	2
1.3	Differente suscettibilità delle mucose all'infezione da HIV-1.	6
1.4	Meccanismi protettivi a livello mucosale.	9
1.5	HIV-1 e la mucosa del cavo orale.	10
1.5.a	Anticorpi salivari virus specifici.	12
1.5.b	Proteine salivari.	12
2	Proteine/peptidi ricchi di prolina (PRP).	16
3	Terapia dell'HIV-1: successi e limiti.	19
4	Latenza di HIV-1 e reservoirs virali.	21
4.1.a	Reservoirs cellulari che supportano l'infezione latente.	22
4.1.b	Reservoirs cellulari che supportano l'infezione produttiva.	24
4.2	Reservoirs extracellulari/ carriers virali.	25
4.3	Reservoirs anatomici.	26
5	Meccanismi di latenza di HIV.	28
5.1	Deficienza dei fattori cellulari necessari per l'espressione di HIV.	28
5.2	Interferenza trascrizionale.	29
5.3	Restrizioni della cromatina.	29
5.4	Persistenza per via omeostatica.	31

SCOPO DELLA TESI	32
-------------------------	-----------

MATERIALI E METODI

6	Sintesi dei peptidi.	34
7	Caratterizzazione dei peptidi salivari.	34
8	Purificazione dei peptidi.	35
9	Valutazione della citotossicità su PBMC.	36
10	Valutazione citofluorimetrica dell'attività pro-apoptotica.	37
11	Valutazione <i>ex vivo</i> dell'attività inibitoria su HIV-1.	37
12	Valutazione <i>in vitro</i> dell'attività inibitoria su HIV-1 dei peptidi salivari e dei loro frammenti.	38
13	Valutazione della formazione dei sincizi.	38
14	Valutazione della localizzazione cellulare in microscopia confocale.	39
15	Valutazione dell'inibizione dell'attività Tirosin-chinasica (hck).	40

RISULTATI	43
------------------	-----------

DISCUSSIONE	50
--------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	55
---------------------	-----------

INTRODUZIONE

1.1. HIV: diffusione e modalità di trasmissione.

Il virus HIV (Human Immunodeficiency Virus), agente eziologico nell'uomo della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), è un retrovirus appartenente alla famiglia dei *Lentivirinae*. Fu isolato in Francia nel 1982 e denominato inizialmente LAV, ARV, HTLV-III; solo in seguito fu chiamato HIV [1, 2]. Di esso esistono due sierotipi dominanti: HIV-1, principale responsabile della pandemia da AIDS, ed HIV-2, a virulenza attenuata.

Da quando ha fatto la sua comparsa quasi 30 anni fa, HIV ha infettato più di 60 milioni di persone in tutto il pianeta ed ha causato più di 20 milioni di decessi. L'AIDS è attualmente la quarta causa di morte nel mondo e la prima nell'Africa sub-sahariana.

HIV-1 è epidemico in Europa, America e Africa centrale, mentre HIV-2 è prevalente nell'Africa occidentale. Il sottotipo B di HIV-1 è il ceppo più diffuso nei Paesi industrializzati.

In Europa, USA e nelle altre aree geografiche dove è comparso di recente, HIV colpisce quasi esclusivamente alcune categorie di persone: tossicodipendenti per via endovenosa, maschi omo- e bisessuali, eterosessuali promiscui, pazienti politrasfusi, partners eterosessuali di soggetti sieropositivi e figli di madri infette. Tuttavia, il fatto che l'incidenza dell'infezione negli individui eterosessuali senza fattori di rischio sia in continuo aumento, fa purtroppo temere per una più ampia generalizzazione del contagio.

E' ormai assodato che le principali modalità di trasmissione interumana di HIV riguardano circostanze e comportamenti che implicano scambio di sangue, derivati del plasma, sperma e liquido seminale, secrezioni vaginali, saliva, latte materno, essudati, urina ed altri fluidi biologici contenenti il virus o cellule da esso infettate [3;4].

HIV si trasmette essenzialmente in tre modi:

a) il contatto sessuale rappresenta la forma di contagio più frequente, sia tra i maschi omosessuali sia tra gli eterosessuali. Il virus è presente nel liquido seminale, ed infetta il partner sieronegativo attraverso la mucosa rettale o vaginale. Nei rapporti eterosessuali il rischio di contrarre HIV è maggiore per le donne che per gli uomini a causa della maggiore presenza di co-recettori CCR5 e CXCR4 sulle cellule della mucosa vaginale;

b) la seconda via d'infezione è l'inoculo di sangue infetto o di prodotti ematici; ad oggi, lo scambio di siringhe tra soggetti che fanno uso di droghe per via iniettiva rappresenta la causa preponderante nella maggior parte dei casi di contagio per tale via. Infatti, con l'avvento dello screening routinario del sangue e dei prodotti destinati alla trasfusione, la possibilità di trasmissione accidentale del virus a pazienti trasfusi o trattati con emoderivati è diminuita drasticamente;

c) la trasmissione verticale da madre sieropositiva è responsabile della maggior parte dei casi di AIDS pediatrico; più di frequente si verifica in utero o in fase perinatale, nonostante il contagio possa avvenire anche tramite il latte materno. La trasmissione perinatale ha un forte impatto nella diffusione dell'epidemia da HIV soprattutto nei Paesi in via di Sviluppo, essendo responsabile di circa 1800 nuove infezioni al giorno [5]; tuttavia questa può essere significativamente ridotta (<2%) se le madri assumono correttamente la terapia farmacologia antiretrovirale nel corso della gravidanza e se rinunciano all'allattamento.

1.2. Incidenza dell'infezione da HIV-1 per via orale.

E' ormai noto che il virus dell'immunodeficienza umana si trasmette in modo poco efficiente per via orale. Vari studi epidemiologici hanno comprovato l'assenza di casi documentati di trasmissione dovuti a bacio o a scambio di utensili da cucina [6] forse perché la concentrazione virale nella saliva, specie se rapportata a quella del liquido seminale o del latte materno, è troppo bassa per produrre una trasmissione efficace.

La potenzialità di trasmissione per via orale dell'infezione da HIV-1 è stata studiata in modelli di infezione con SIV in macachi rhesus; basse concentrazioni di SIV per via orale hanno portato allo sviluppo dell'infezione in tutti gli animali neonati esposti, mentre gli animali adulti si sono infettati solo utilizzando

concentrazioni superiori a quelle necessarie per infettare i neonati o per contrarre l'infezione per via intravenosa [7].

E' ormai assodato che il rischio di trasmissione del virus attraverso pratiche di sesso orale è significativamente più basso di quello per via anale o vaginale anche se è piuttosto difficile fare una stima precisa di tale rischio; il contatto oro-genitale attivo è in genere associato ad una maggiore probabilità di contrarre l'infezione rispetto al contatto passivo a causa di diversi cofattori (Tab. 1) tra cui la presenza di ulcerazioni genitali o del cavo orale, sanguinamento gengivale (gengiviti e periodontiti) o di infezioni orali [8].

Tab. 1 Fattori che incrementano il rischio di contrarre l'infezione da HIV-1 per contatto oro-genitale [8].

Traumi
Ulcerazioni o abrasioni delle mucose orale e genitale
Infiammazioni gengivali
Infezioni sessualmente trasmesse (STI) ^a
Eiaculazione nel cavo orale (bolo) ^b
RNA retrovirale ^c
Altre infezioni orali (Herpes simplex ecc.)

^a Nel tratto orale o genitale.

^b Ricevente l'eiaculazione.

^c Misurato nelle secrezioni genitali, anali e salivari.

Un altro aspetto importante a questo proposito è l'interazione tra HIV ed i microorganismi del cavo orale; si sa infatti che il virus erpetico umano (HHV) è in grado di modulare la replicazione di HIV-1 e che HHV-8 ne incrementa la replicazione sia *in vitro* che *in vivo* [9]. E' inoltre stato dimostrato che la produzione a livello vaginale di perossido d'idrogeno da parte dei Lattobacilli, presenti tra l'altro anche nel cavo orale, è responsabile della normale omeostasi della mucosa e la sua assenza è correlata con una maggiore suscettibilità a vari

tipi di infezione (vaginiti ed infezioni urinarie da *E.coli*) ed ad un incrementato rischio della trasmissione di HIV-1 [10].

Alcuni studi hanno documentato che il rischio di contrarre l'infezione da HIV nel corso di rapporti orali non protetti risulta molto più elevato in presenza di ulcerazioni orali, processi infiammatori o infezioni sessualmente trasmesse (STI) nel tratto orofaringeo. Dati epidemiologici relativi alla popolazione britannica indicano che il 19% dei casi d'infezione da gonococco nella popolazione omosessuale maschile ed il 4% in quella femminile sono dovuti a localizzazione orofaringea del batterio. Questo tipo di infezioni si trasmette più facilmente rispetto ad HIV con rapporti orali ed il recente incremento di tali patologie (sifilide e gonorrea) in molti stati europei e negli USA, soprattutto nella popolazione omosessuale, fa temere che possa risultare in un incremento delle nuove infezioni da HIV [11; 12].

Per concludere, un excursus dei principali studi epidemiologici che sono stati condotti a partire dal 1990 sulla trasmissione orale di HIV-1 è schematizzato in tabella 2.

Tab. 2 Studi epidemiologici sulla trasmissione orale di HIV-1^a[13].

Studio	Risultati	Conclusioni principali
Kuiken <i>et al.</i> (1990)	Casi: 84 HIV+ MSM Controlli: 168 HIV- MSM POI: RR 1,12 (0,59-2,12) AOI: RR 1,5 (0,81-2,78)	L'esposizione orale non è un fattore di rischio indipendente
Samuel <i>et al.</i> (1993)	Casi: 83 HIV+ MSM Controlli: 249 HIV- MSM POI: RR 5,3 (2,0-19) AOI: RR 3,6 (1,4-13)	L'esposizione orale non è un fattore di rischio indipendente
Raiteri <i>et al.</i> (1994)	18 coppie lesbiche sierodiscordanti praticanti sesso orale non protetto studiate per 3 mesi. Nessuna sieroconversione	Non c'è rischio di trasmissione
Ostrow <i>et al.</i> (1995)	Casi: 76 HIV+ MSM Controlli: 389 HIV- MSM POI: RR 0,95 (0,89-1,01)	L'esposizione orale non è un fattore di rischio indipendente ma ci sono dati ai limiti di detection
Faruque <i>et al.</i> (1996)	2323 individui, 18-19 anni POI con ulcerazioni orali: OR 1,9 (1,0-3,6)	L'esposizione orale è indipendentemente associata ad HIV, soprattutto tra gli individui con ulcerazioni orali
Wallace <i>et al.</i> (1997)	3073 prostitute POI: pratica prevalente 35,4% meno prevalente 24,2% (P<0,0001)	L'esposizione orale è associata ad HIV, soprattutto tra i tossicodipendenti
Page-Shafer <i>et al.</i> (1997)	345 HIV+ MSM; 345 HIV- MSM senza POI; RR 1,05 (1,00-1,11)	L'esposizione orale è associata in modo significativo alla sieroconversione
de Vincenzi (1994)	50 coppie eterosessuali sierodiscordanti con rapporti protetti e sesso orale non protetto	Dopo 2 anni di follow-up non si sono riscontrati casi di trasmissione di HIV
Dillon <i>et al.</i> (2000)	102 HIV+ MSM 16,4% casi dovuti a sesso orale	Le reviews più esaustive presentano percentuali dell'8%
del Romero <i>et al.</i> (2002)	135 HIV+ (110 donne, 25 uomini) praticanti un totale di 1900 rapporti orali non protetti con il partner HIV+ durante i 210 follow-up/anno	L'esposizione orale non è un fattore di rischio indipendente

^a questa tabella comprende solo gli studi epidemiologici dal 1990, non include i case reports.
MSM: men who have sex with men; POI: passive oral intercourse; AOI: active oral intercourse.

1.3. Differente suscettibilità delle mucose all'infezione da HIV-1.

Come appena descritto, la maggior parte delle nuove infezioni da HIV è dovuta a trasmissione attraverso le mucose dell'apparato genitale e gastrointestinale. Le mucose rappresentano infatti la principale porta d'ingresso del virus, il luogo preferenziale della replicazione e della proliferazione virale ed il sito che subisce maggiormente la deplezione di cellule T CD4+ che conduce progressivamente all'immunodeficienza.

Gli eventi cellulari e molecolari che avvengono nei primi momenti della trasmissione dell'infezione non sono ancora completamente noti ed i dati che possediamo in relazione all'interazione tra virus e cellule infettate con la superficie epiteliale delle mucose umane derivano in gran parte da sperimentazioni *in vitro*. Tuttavia è risaputo che la trasmissione di HIV-1 attraverso una mucosa integra dipende dalla sopravvivenza del virus e delle cellule infettate nelle secrezioni mucosali nonché dall'efficienza del trasporto attraverso la barriera epiteliale che favorisce il raggiungimento dei target cellulari suscettibili.

In assenza di danno tissutale dovuto ad infezione o trauma, HIV utilizza i normali meccanismi di riconoscimento antigenico designati al monitoraggio immunologico. Nell'epitelio squamoso stratificato del prepuzio, della vagina, della mucosa orale, delle tonsille e del canale anale le APC catturano il virus mentre le cellule dendritiche, tramite le loro estese propaggini, riconoscono la gp120 virale attraverso le lectine di membrana (ICAM-3) (Fig.1 (3)). Nell'epitelio semplice ed in quello cilindrico dell'intestino tenue, della cervice uterina e del retto, tuttavia, gli spazi intracellulari sono sigillati dalle giunzioni occludenti. In queste sedi, le cellule specializzate epiteliali M trasportano gli antigeni all'interno di vescicole attraverso la barriera epiteliale fino ai sottostanti follicoli linfoidi (Fig.1 (2)) [14].

Nella mucosa gastroenterica si pensa che HIV attraversi la barriera epiteliale per transitosi dalla superficie apicale delle cellule epiteliali. In colture primarie di cellule epiteliali intestinali (IEC) si è osservato che tali cellule, in aggiunta al CCR5 ma non al CD4, esprimono sulla porzione apicale la galattosilceramide (GalCer), un recettore alternativo di riconoscimento di HIV [15]. In questo modo,

le IEC, attraverso la GalCer ed il CCR5, favoriscono la transitosi selettiva di ceppi R5, che sono trasmessi prevalentemente a livello mucosale (Fig.1 (1)). Dopo l'acquisizione iniziale, indipendentemente dalla via d'ingresso, le cellule dendritiche mucosali o le cellule T infette migrano dalle regioni sub-epiteliali verso le aree ricche di cellule T del MALT e dei linfonodi dove infettano i linfociti T ed i macrofagi attraverso il recettore CD4 ed i co-recettori CCR5 e CXCR4.

Nonostante l'esistenza di vie comuni di trasmissione dell'infezione virale, i vari distretti mucosali presentano comunque notevoli differenze in quanto a suscettibilità/resistenza all'infezione da HIV a cui contribuiscono numerosi fattori. Infatti, ogni distretto ha caratteristiche peculiari, come il grado di esposizione al virus, l'architettura strutturale tissutale, i fattori ambientali locali e la composizione della popolazione cellulare residente.

Traumi, infiammazioni o ulcerazioni possono distruggere la barriera epiteliale e fornire ad HIV un accesso diretto alla microcircolazione mucosale e/o generare il signaling direzionale per il reclutamento di monociti e linfociti T attivati particolarmente suscettibili all'infezione (Fig.1 (4-5)) [16].

L'elevata suscettibilità del tratto gastrointestinale è dovuta, ad esempio, ad una maggiore percentuale di cellule T CD4+/CCR5+ residenti (>50%) rispetto ai linfonodi (5-10%) o al sangue periferico (10-30%); inoltre il tratto GI contiene una quota significativamente superiore di cellule T Ki67 attivate in grado di propagare l'infezione [17].

In uno studio trasversale, condotto su diverse donne sieropositive, è stato valutato il ruolo dell'ambiente mucosale in relazione alla suscettibilità al virus [18]. In questo studio, l'RNA virale ed il numero di particelle infettanti sono stati monitorati nei compartimenti mucosale e sistemico per poi essere correlati con i meccanismi dell'immunità innata ed adattativa. Nonostante nelle donne prese in esame l'RNA virale potesse essere reperito sia nella cavità orale che nel tratto genitale anche in assenza di HIV RNA nel sangue, nella maggior parte dei casi c'era una correlazione tra i livelli di RNA plasmatico e mucosale. Tuttavia, i livelli di HIV RNA mucosale potevano essere elevati anche in assenza di particelle infettanti, evidenziando che, in aggiunta ai fattori sistemici, il

microambiente mucosale locale può influenzare la replicazione, la diffusione e la trasmissione del virus.

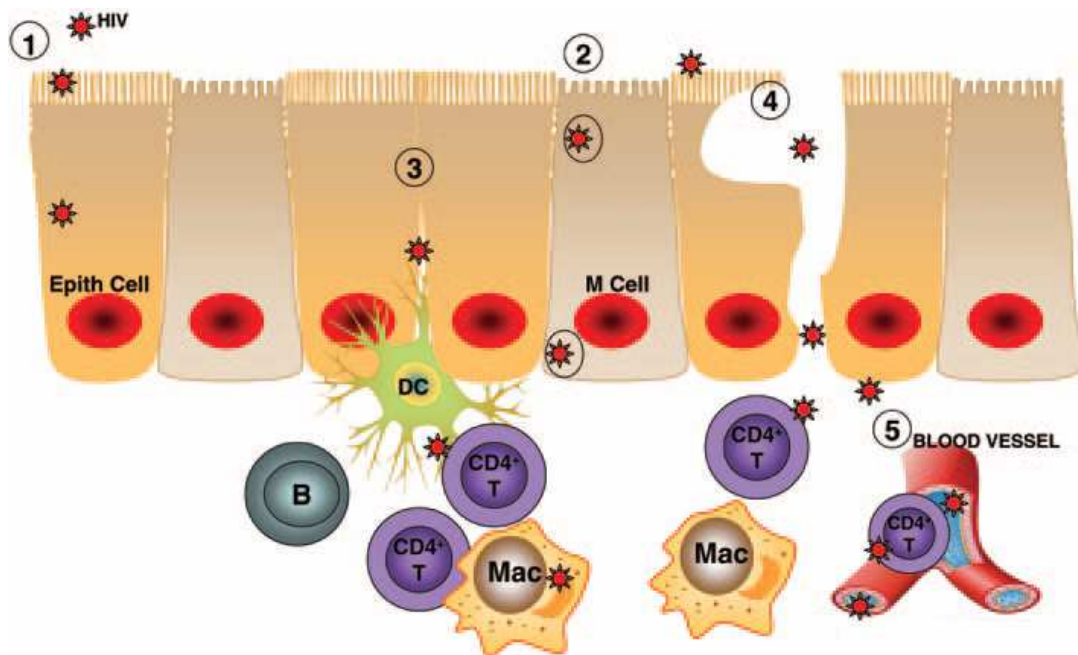


Fig.1: Potenziali vie d'ingresso di HIV nelle mucose. Il virus può utilizzare diverse modalità per penetrare attraverso le mucose, che rappresentano la porta d'ingresso principale dell'infezione. **(1)** Il virus può riconoscere GalCer sulla porzione apicale delle cellule epiteliali ed entrare per transitosi; **(2)** il trasporto dalla superficie luminale al distretto sottoepiteliale può avvenire grazie alle cellule M; **(3)** il riconoscimento e la cattura di HIV da parte delle cellule dendritiche grazie all'interazione con la gp120 può favorire il trasporto e la presentazione del virus ai target cellulari suscettibili; **(4)** grazie ad eventi traumatici, infezioni od ulcerazioni il virus può attraversare l'epitelio danneggiato e raggiungere facilmente le cellule T CD4+/CCR5+ ed i macrofagi lì residenti o reclutati per chemiotassi da altri distretti; **(5)** la perdita di integrità tissutale può consentire al virus di raggiungere direttamente il microcircolo mucosale per poi disseminarsi a livello sistemico [18].

1.4. Meccanismi protettivi a livello mucosale.

Nella difesa contro HIV sono coinvolte sia l'immunità innata che quella adattativa; tuttavia, nei primi stadi dell'infezione, l'immunità innata risulta cruciale. In questi meccanismi sono interessate le risposte cellulo-mediate, così come la secrezione di fattori solubili. Le cellule immunitarie che intervengono in queste fasi presentano infatti caratteristiche protettive uniche; i linfociti $T\gamma\delta$, per esempio, agiscono nella protezione delle mucose e nella lisi di target cellulari infettati da HIV o SIV [19], mentre le cellule NK funzionano da effettori nei primi stadi dell'infezione rispondendo alla perdita di espressione dell'MHC I da parte delle cellule infettate. I $CD8^+$ giocano un ruolo fondamentale, come evidenziato nei soggetti HIV+ LTNP, secernendo defensine in grado di inibire la replicazione virale [20]. Inoltre, le cellule dendritiche, i macrofagi ed i linfociti $T\gamma\delta$ dei tessuti sub-epiteliali producono svariate citochine e chemochine che interferiscono con la replicazione e trasmissione di HIV, come dimostrato dal ruolo delle CC chemochine (RANTES, MIP1- α e MIP1- β) in qualità di inibitori dell'entry.

Le molecole dell'immunità innata che intervengono nella difesa antivirale comprendono le proteine del complemento ma anche vari peptidi antimicrobici e glicoproteine. La cascata del complemento provvede alla lisi ed opsonizzazione dei patogeni ed agisce da richiamo chemiotattico per le cellule dell'immunità specifica. Nelle infezioni da HIV il complemento viene attivato sia per via classica che alternativa portando all'opsonizzazione virale. Tale processo, tuttavia, non sempre ha successo, a causa dei meccanismi sviluppati da HIV per eludere la sorveglianza immunitaria [21; 22].

Tra i peptidi antimicrobici, invece, si possono annoverare le defensine, le istatine, la stearina, la cistatina, i peptidi ricchi di prolina e gli SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor). Le defensine, per esempio, sono peptidi cationici non glicosilati ricchi di arginina; ad oggi sono state caratterizzate tre classi di defensine: le α (secrete da neutrofili, macrofagi e linfociti $T\gamma\delta$), le β (prodotte dalle cellule epiteliali) e le θ ; solo di recente si è riusciti a dimostrare la loro capacità di bloccare la replicazione di HIV-1 inibendo la trascrittasi inversa [23; 24].

In aggiunta ai peptidi antimicrobici, nelle secrezioni mucosali sono state individuate diverse glicoproteine ad attività antivirale. La trombospondina, ad esempio, inibisce il virus bloccandone l'entry [25], mentre la lattoferrina, prodotta dai neutrofili, lega la gp120 ostacolando la fusione e l'entry [26]. Le mucine, infine, rimuovono la gp120 dai virioni rendendoli incapaci di infettare la cellula ospite [27].

Il ruolo dell'immunità adattativa nell'infezione da HIV, invece, è ancora controverso. In diversi studi condotti su soggetti resistenti all'infezione (prostitute, operatori sanitari ripetutamente esposti al virus e figli di madri infette) sono stati osservati anticorpi protettivi e risposte cellulari che hanno permesso di ipotizzare un ruolo dei meccanismi alloimmunitari nelle risposte protettive specifiche contro HIV [20]. Gli antigeni dell'HLA sono espressi sulla superficie di linfociti T CD4+, macrofagi, neutrofili e cellule epiteliali seminali e la continua esposizione al virus può portare all'alloimmunizzazione mucosale. A questo proposito, in studi condotti su coorti di soggetti HIV sieronegativi CCR5+ esposti ripetutamente ad HIV per via sessuale, si è osservato che la resistenza all'infezione è associata alla presenza di anticorpi IgA anti-gp160 nelle secrezioni del tratto urogenitale [28] e si è visto che le IgA1 estratte da vari fluidi corporei (saliva, siero e lavaggi cervico-vaginali) di prostitute kenote resistenti all'infezione sono in grado di neutralizzare *in vitro* l'infezione in cellule del sangue periferico (PBMC) [29].

1.5. HIV-1 e la mucosa del cavo orale.

A differenza di quelle genitali e gastrointestinali, la mucosa orale rappresenta una via di contagio piuttosto inusuale, anche se il contatto oro-genitale, soprattutto se in presenza di afte, erosioni, ulcerazioni o processi infiammatori che portano a sanguinamento (gengiviti e periodontiti), può portare ad un incremento del rischio di contrarre l'infezione per questa via. In effetti, particelle virali infettanti sono state raramente isolate dalla saliva, a conferma della mancanza di casi accertati di trasmissione orale riportata in molti studi epidemiologici. Queste evidenze non sono tuttavia legate alla totale assenza di virus nel cavo orale (infatti RNA virale, DNA provirale e cellule infette vengono

di frequente detectati nei tessuti orofaringei e nelle secrezioni salivari di soggetti sieropositivi) ma sembrano piuttosto correlate alla presenza di fattori antivirali mucosali endogeni in grado di bloccare l'infezione da HIV-1 attraverso vari meccanismi d'azione.

Nonostante la trasmissione orogenitale costituisca un evento piuttosto raro, la trasmissione verticale da madre a figlio nel corso dell'allattamento al seno può invece avvenire, anche se con una bassa incidenza [30]. Ciò potrebbe essere dovuto ad una incompleta maturazione del sistema mucosale nel neonato che conferirebbe una maggiore suscettibilità all'infezione per questa via.

I fattori che contribuiscono a questa resistenza ad HIV per via orale sono svariati; innanzitutto la mucosa, già di per sé, costituisce una barriera fisica all'ingresso dei patogeni; inoltre, i fluidi del cavo orale lubrificano e lavano continuamente questo distretto, drenando HIV ed altri patogeni direttamente all'interno dell'apparato gastrointestinale. L'ipotonicità della saliva ostacola la produzione di particelle infettanti da parte dei leucociti, determinandone la lisi delle pareti cellulari e prevenendone il legame all'epitelio mucosale e la produzione di nuovi virioni [31].

Nonostante la presenza di HIV all'interno del cavo orale, i titoli virali salivari sono in genere di gran lunga inferiori se comparati a quelli ematici o delle secrezioni genitali e questo porta ad ipotizzare che nel cavo orale siano presenti altri fattori inibenti l'infezione oltre a quelli appena citati.

L'attività antivirale della saliva fu evidenziata già nel 1986 da Patricia Fultz su *Lancet*, dove si dimostrava come un pre-trattamento di HIV-1 con saliva umana o di scimpanzé fosse in grado di ridurre l'infettività *in vitro* su PBMC attivati. Questa azione protettiva della saliva veniva meno solo nel corso di infezioni sperimentali con dosi massive di virus (ad esempio in infezioni sperimentali con SIV condotte sui macachi) [33].

Studi successivi, oltre a confermare queste osservazioni, hanno permesso di individuare almeno parzialmente i meccanismi attraverso cui la saliva inibisce l'infezione. Tra questi si possono annoverare le risposte anticorpali virus-specifiche, l'aggregazione di particelle infettanti dovuta a glicoproteine ad alto

peso molecolare ed il blocco dei meccanismi di interazione cellula-virus da parte di proteine endogene antivirali.

1.5.a. Anticorpi salivari virus-specifici.

Anticorpi anti-HIV-1 specifici degli isotipi A, G ed M sono stati detectati fin dagli esordi della pandemia nella saliva di soggetti sieropositivi e questo ha consentito lo sviluppo di test diagnostici specifici non invasivi sui fluidi orali.

Tuttavia, è noto che l'infezione da HIV-1 è associata ad un decremento delle concentrazioni di IgA salivari mentre il rapporto esistente tra concentrazioni di IgA sieriche e salivari è dicotomico. Risposte immunitarie sistemiche e secretorie alterate sono segnali tipici dell'infezione da HIV. Durante la progressione della malattia si osserva un incremento della concentrazione sierica delle IgA totali e delle IgG, condizione nota come ipergammaglobulinemia, mentre nelle secrezioni parotidiche di pazienti con HIV/AIDS, confrontati con soggetti non infetti, si osserva una significativa riduzione della concentrazione delle sIgA totali e degli isotipi 1 e 2. In uno studio pubblicato nel 2004 da Vincent N. e colleghi sulla rivista AIDS si dimostra come le IgA purificate dal siero e dalla saliva di soggetti HIV-1 sieropositivi siano in grado di inibire l'interazione tra la gp120 virale ed il recettore CD4. IgA virus-specifiche anti gp160 e p24 sono presenti nella saliva dei pazienti nei primi stadi dell'infezione ma i titoli tendono a calare durante la progressione verso l'AIDS conclamato [35] a causa della diminuzione di flusso salivare che si verifica con l'evolvere della malattia, all'uso di farmaci xerostomizzanti e di patologie alle ghiandole salivari associate all'infezione [36].

1.5.b. Proteine salivari

La saliva di soggetti HIV-1 sieronegativi si è rivelata efficace nell'inibire l'infezione da HIV, dimostrando il coinvolgimento anche di meccanismi non immunologici. L'infezione di monociti primari da parte di HIV è infatti significativamente ridotta in presenza di saliva e si è visto che quest'ultima è in grado di bloccare l'infettività del virus agendo sulla trascrittasi inversa per tre settimane dopo aver esposto i monociti al virus per un'ora [37].

La saliva submandibolare, in particolare, contiene diverse glicoproteine ad alto peso molecolare tra cui le agglutinine (SAG), che bloccano la gp120 ostacolandone il legame al recettore CD4 [38] e le mucine, che sequestrano HIV formando complessi che possono essere eliminati dall'organismo. La saliva contiene inoltre un'altra glicoproteina ad alto peso molecolare, la trombospondina-1 (TSP-1) che inibisce *in vitro* l'infezione di PBMC bloccando la gp120. Si è visto tuttavia, che la rimozione di queste proteine ad alto peso molecolare dalla saliva non ne inficia completamente l'attività antivirale, facendo ipotizzare che anche altre proteine solubili più piccole possono essere implicate. Tra queste si possono citare ad esempio il componente C1q del complemento, che lega il virus in associazione alla fibronectina riducendone la trasmissione.

Le defensine, invece, sono piccoli peptidi a struttura ciclica che fungono da mediatori dell'immunità innata delle mucose e che inibiscono l'ingresso di HIV nei linfociti. Si è infatti visto che le α -defensine inibiscono efficacemente l'infezione da HIV *in vitro* [39] e che le β -defensine bloccano la replicazione nelle cellule immunocompetenti mediante un duplice meccanismo che vede, da un lato il legame diretto ad HIV-1 mentre dall'altro comporta una modulazione negativa dell'espressione del co-recettore CXCR4 sulla superficie cellulare [40]. Nel 1986 Thompson e Ohlsson hanno isolato per la prima volta la proteina SLPI (secretory leucocyte protease inhibitor) dalle secrezioni parotidiche. Si tratta di una proteina non glicosilata secreta dall'epitelio acinoso delle ghiandole sottomandibolari ed è in grado di inibire la replicazione *in vitro* di HIV a concentrazioni fisiologiche dose-dipendenti. Nonostante sia maggiormente presente nella saliva, l'SLPI si trova anche nel liquido seminale, nelle secrezioni cervico-vaginali, nel latte materno, nelle lacrime, nel liquido sinoviale e nei fluidi cerebrospinali.

Il meccanismo attraverso il quale la proteina SLPI inibisce l'infezione da HIV sembrerebbe maggiormente correlato con il target cellulare piuttosto che con un'azione diretta sul virus. Come dimostrato da McNeely, l'attività antivirale viene conservata quando le cellule pre-trattate con SLPI vengono lavate prima dell'esposizione al virus ma si perde quando il virus viene pre-trattato con SLPI

prima dell'infezione. Studi *in vitro* hanno dimostrato che SLPI si lega alle cellule CD4+ inibendo l'infezione durante le prime fasi del ciclo vitale del virus, probabilmente durante la penetrazione nella cellula ospite o comunque prima della retrotrascrizione.

Nel 2001 Robinovitch *et al.* hanno dimostrato la presenza nella saliva parotidea di peptidi basici ricchi di prolina (PRP) dotati di attività anti-HIV indipendente da quella attribuita alla proteina SLPI o alla TSP-1. Secondo gli autori, questa attività sarebbe dovuta al legame con la gp120 virale che inibirebbe l'entry di HIV nella cellula ospite [41].

Tab. 3 Fattori salivari con attività anti-HIV-1 [13].

Fattore	Meccanismo anti-HIV-1	Autore
Anticorpi anti-HIV	Neutralizzano ed inattivano il virus; le IgA bloccano l'interazione tra gp120 e CD4	Miller et al (1993); Vincent et al (2004); Challacombe and Sweet (2002)
Componente C1q del complemento	In presenza di fibronectina lega il virus e ne determina la sedimentazione	Su and Boackle (1991); Llana-Puy et al (2004)
Cistatine	Hanno attività antimicrobica generale; inibiscono la cisteina proteasi	Bergey et al (1994); McNeely et al (1995)
Defensine (α , β , θ e minidefensine)	Hanno attività antimicrobica generale; bloccano la penetrazione del virus	Nakashima et al (1993); Quinones- Mateu et al (2003); Cole and Leherer (2003)
Lattoferrina	Si lega al ferro bloccando la proliferazione batterica e la replicazione virale	McNeely et al (1995); Puddu et al (1998)
Lattoperossidasi	Inattiva il virus producendo ipotiocianato	Yamaguchi et al (1993)
Lisozima	Interrompe la replicazione virale distruggendo le membrane	McNeely et al (1995); Lee-Huang et al (1999)
Ribonucleasi	Blocca la replicazione del virus distruggendone il corredo genetico	McNeely et al (1995); Saxena et al (1996)
Mucine	Sequestrano ed aggregano le particelle virali	Bergey et al (1994)
SLPI (Secretory leucocyte protease inhibitor)	Interagisce con una molecola di superficie limitando l'entry nelle cellule target	McNeely et al (1997); Farquhar et al (2002); Skott et al (2002); Lin et al (2004)
Trombospondina-1 (TSP-1)	Determina aggregazione del virus; blocca l'interazione virus-linfocita	Crombie et al (1998)
Proteine ricche di prolina (PRP)	Legano la gp120 prevenendone la penetrazione nella cellula ospite	Robinovitch et al (2001)
Agglutinine salivari (SAG)/ Mucina MG2	Legano la gp120; agglutinano HIV e determinano la dissociazione delle proteine dell'envelope	Challacombe and Sweet (2002); Shugars et al (2002)
Effetto ipotonico	Lisi di linfociti infettati da HIV-1	Baron et al (2001); Challacombe, Sweet (2002);

2. Proteine/peptidi ricchi di prolina (PRP).

La produzione di peptidi e di piccole proteine ad attività antimicrobica, chiamati AMP (antimicrobial peptides), è considerata un meccanismo immunologico ancestrale ed è stata a lungo studiata negli insetti e negli invertebrati. Inoltre, una grande varietà di AMP presenti nelle secrezioni della pelle degli anfibi è stata ben caratterizzata ed esistono molte evidenze a suffragio dell'ipotesi che gli AMP giochino un ruolo cruciale anche nei meccanismi immunitari dei mammiferi, compreso l'uomo.

I peptidi antimicrobici si trovano in tutti i distretti dell'organismo generalmente esposti a contaminazione microbica, come la pelle e le mucose, ma sono presenti in grande quantità anche in diverse classi di cellule ematiche come i neutrofili, gli eosinofili e le piastrine.

La produzione degli AMP può essere costitutiva, anche se più frequentemente è conseguenza di danno tissutale o di infiammazione e ciascun tessuto possiede un suo profilo precipuo, che può variare significativamente in relazione alle condizioni fisiologiche del momento. La grande maggioranza degli AMP deriva dalla digestione proteolitica di precursori più grandi e la loro sintesi avviene sottoforma di miscela di peptidi e proteine. Anche se alcuni AMP predominano in specifici distretti corporei, solo pochi sono prodotti esclusivi di alcuni tessuti o tipi cellulari; inoltre la maggior parte di essi è multifunzionale ed agisce in sinergia con altri meccanismi dell'immunità innata o adattativa.

Negli ultimi anni sono stati isolati da insetti, anfibi e mammiferi numerosi peptidi biologicamente attivi caratterizzati da un contenuto di prolina superiore al 50% e per tale ragione denominati PRP (proline rich peptides/proteins). La loro funzione principale è di carattere antimicrobico, nonostante alcuni di essi si siano rivelati multifunzionali, affiancando all'attività antimicrobica la capacità di modulare la formazione di complessi proteici e di intervenire in svariati processi cellulari tra cui lo stress ossidativo, la formazione del citoscheletro e la motilità cellulare. I peptidi antimicrobici ricchi di prolina sono stati originariamente isolati dagli insetti, come le drosocine delle specie Hymenoptera, Lepidoptera, Hemiptera e Diptera, che uccidono soprattutto batteri Gram-negativi senza provocarne la lisi di membrana; la loro sequenza è caratterizzata dalla

ripetizione del tripeptide Pro-Arg-Pro. Un altro tipico esempio sono le pirrocoricine, isolate da *Pyrrhocoris apterus* e le apidaecine, isolate dall'*Apis mellifera*; queste proteine mostrano un ampio grado di conservazione della sequenza PRP-PHPRI/L nell'estremità C-terminale.

Le proteine ricche di prolina sono state isolate anche nei mammiferi, dove rappresentano circa i due terzi della frazione totale proteica presente nei dotti salivari parotideo e sottomandibolare; la loro permanenza nel cavo orale, tuttavia, è piuttosto breve a causa del continuo drenaggio cui sono soggetti. Nonostante l'abbondanza nella saliva dei primati, queste proteine sono di norma poco concentrate nella saliva di ratti e conigli e sono totalmente assenti in cavalli, cani e gatti.

Esistono due gruppi principali di PRP, le proteine acide e quelle basiche che possono essere o meno glicosilate. Le PRP appartengono ad un'unica grande famiglia multigenica di fosfoproteine salivari specifiche ricche di prolina, glicina e glutammato che sono abbastanza inusuali quanto a composizione aminoacidica [42]. Queste proteine sono codificate da geni presenti sul cromosoma 12p13.2; due geni PHR codificano per le PRP acide, mentre quattro geni PRB codificano per quelle basiche e glicosilate. Questi geni sono soggetti di frequente a polimorfismo; quest'ultimo, insieme a mutazioni puntiformi, modificazioni post-trasduzionali e crossing-over porta ad un prodotto genico molto complesso [43], come evidenziato dalla migrazione di campioni di saliva su SDS-PAGE, da cui sono emerse molte varianti polimorfiche dei profili delle PRP salivari e notevoli differenze interindividuali [44].

Le PRP sono proteine "appiccicose" che possono legarsi ad altre molecole grazie ad almeno tre conformazioni dovute alla presenza di residui fosforici che formano ponti cationici divalenti, di glicani coinvolti nella formazione di legami simili a quelli lectinici, della superficie idrofobica piatta dei residui di prolina nonché alla presenza dei legami amidici che li precedono [45].

Le PRP basiche generano da una complessa serie di processi pre-secretori di frammentazione delle pro-proteine e dopo la secrezione vanno incontro ad un'ulteriore intervento di frammentazione ad opera di proteasi endogene ed esogene (della flora orale) [46].

In studi condotti da Newman, Beeley e MacFarlane [47;48] è emerso che batteri che colonizzano precocemente la superficie dentale come lo *Streptococcus gordonii* si legano in modo specifico alle PRP basiche grazie a legami cationici divalenti tra i gruppi fosfato delle PRP e la superficie batterica. Le variazioni polimorfiche di queste proteine, quindi, potrebbero essere alla base delle differenze interindividuali esistenti nella microflora del cavo orale e conseguentemente della suscettibilità alle infezioni e dello sviluppo di patologie a carico di questo distretto.

Le PRP acide sono leganti del calcio e molte di loro agiscono da reservoirs per la rimineralizzazione inibendo la precipitazione del calcio fosfato e mantenendo la saliva satura di questo minerale. L'esatto ruolo delle PRP basiche non è stato finora ben compreso, anche se sono riportate attività di difesa nei confronti di infezioni fungine da *Candida albicans* [49]. Si è osservato inoltre che le proteine basiche Ps1 e Ps2 sono in grado di legarsi specificatamente alle cellule della mucosa orale, indicando una loro possibile responsabilità nei processi di colonizzazione batterica delle mucose [50].

E' noto da tempo che la saliva è dotata di proprietà antivirali, anche se la natura di quest'attività non è stata ancora del tutto chiarita. La saliva ha infatti manifestato in saggi *in vitro* la capacità di inibire l'infettività dell'Herpes simplex e le PRP basiche sono risultate esserne responsabili insieme alle cistatine [51]. Inizialmente, i componenti responsabili dell'attività antivirale della saliva si pensava fossero esclusivamente l'SLPI e la trombospondina-1 come riportato da McNeely nel 1995 e Shugars e Wahl nel 1998. Successivi studi condotti da Robinovitch et al. circa l'attività inibitoria anti-HIV della saliva parotidea hanno dimostrato che l'SLPI da solo non è in grado di supportare interamente questo effetto antivirale. Inoltre, studiando campioni di saliva parotidea prelevata da soggetti sani, è emersa un'attività inibitoria anti-HIV-1 in circa la metà dei campioni che risultava essere correlata con la variabilità genetica, sia qualitativa che quantitativa, delle proteine salivari basiche ricche di prolina. Questi inibitori salivari sono stati poi analizzati con l'SDS-PAGE ed identificati come le proteine ricche di prolina corrispondenti a PRP Ps1 ed IB1-9 [50]. Il saggio utilizzato non misurava l'attività inibitoria dell'SLPI ed i pesi molecolari

considerati erano notevolmente inferiori di quello della TSP-1, quindi escludevano l'attività inibitoria di questi due fattori. E' stato inoltre dimostrato che le PRP basiche coinvolte si legano specificatamente alla gp120 virale e che sono in grado di inibire sia ceppi T che M-tropici; questa inibizione sembra coinvolgere le interazioni tra virus e cellula ospite prima dell'introduzione del gene *tat*.

3. Terapia dell'HIV-1: successi e limiti.

Oggi la terapia dell'infezione da HIV e dell'AIDS si avvale in prevalenza della combinazione di tre classi di farmaci antiretrovirali diretti contro proteine strutturali del virus che non hanno una controparte nelle cellule umane: gli inibitori nucleosidici (AZT, Abacavir, Stavudina) e non nucleosidici (Nevirapina, Efavirenz) della trascrittasi inversa, gli inibitori dell'integrasi (Raltegravir) e gli inibitori della proteasi virale (Ritonavir, Atazanavir, Darunavir, Nelfinavir). Recentemente è stata introdotta una nuova classe di farmaci che inibisce il processo di fusione tra virus e cellula ospite (Maraviroc, Efuvertide).

L'approccio terapeutico oggi più praticato è quello conosciuto come HAART (highly active antiretroviral therapy), basato sulla co-somministrazione di farmaci appartenenti alle tre classi sopra citate. Questo tipo di terapia è in grado di ridurre al di sotto del limite di sensibilità del metodo di rivelazione i valori plasmatici di viremia nella maggior parte dei pazienti trattati per tre anni. Tuttavia, gli svantaggi della HAART sono rappresentati da un lato dal costo elevatissimo, dall'altro dalle difficoltà logistiche imposte da uno schema posologico molto complesso, nonché dall'elevata tossicità. Non da ultimo occorre poi ricordare l'insorgenza di ceppi di HIV resistenti ad uno o più farmaci antiretrovirali.

Altro limite dei farmaci attualmente in uso è l'incapacità di eliminare i reservoirs virali latenti e quindi di eradicare definitivamente il virus dall'organismo. Infatti, il virus si avvale di un meccanismo replicativo che ne rende estremamente difficile l'eradicazione totale. E' infatti ormai noto che il virus si integra in alcuni organi dove risulta inaccessibile anche all'azione dei farmaci che inibiscono in modo efficace aspetti chiave del suo ciclo vitale, formando in tal modo dei

reservoirs virali che, soprattutto se generati nelle fasi precoci dell'infezione, rappresentano uno degli ostacoli principali nella cura dell'infezione.

Dal momento in cui un paziente inizia la terapia HAART è possibile osservare un decadimento multifasico della viremia dovuto all'esistenza di molteplici sorgenti del virus. Durante le prime due settimane di terapia valori di HIV RNA pari a 10^2 – 10^7 copie/ml di plasma subiscono in genere un drastico abbattimento (circa due logaritmi); questo indica una rapida clearance del virus libero e delle cellule T CD4+ infettate produttive a breve emivita. Una seconda fase di calo più lenta corrisponde invece alla deplezione delle cellule infettate ad emivita più lunga come i macrofagi, i linfociti T CD4+ poco attivati o le cellule follicolari dendritiche cui è legato reversibilmente il virus. La monoterapia con inibitori dell'integrasi come il Raltegravir evidenzia tuttavia l'assenza della seconda fase di decadimento suggerendo che il virus origina sia dalle cellule a lunga emivita di nuova infezione sia dalle cellule attivate con infezione latente e HIV DNA non integrato. La viremia tende a scendere infine sotto valori non più rilevati dai metodi diagnostici attualmente in uso (50 copie/ml). E' stata inoltre suggerita una quarta fase durante la quale la viremia è molto stabile, con valori mediani intorno a 1,5 copie/ml ed un decadimento quasi impercettibile, indicativo della presenza di reservoir virali a lunga emivita, potenzialmente precursori di origine ematopoietica. Nel corso della terapia HAART possono verificarsi episodi denominati "blips" in cui si osserva un considerevole aumento della replicazione virale; tale aumento si può verificare anche dopo interruzione della terapia stessa o in seguito all'emergenza di varianti resistenti dopo lunghi periodi di trattamento [55].

Un dettagliato studio sui reservoirs di HIV è discusso nel report di Richard Jeffreys sul Workshop dell'International AIDS Society del 2010. Tale report mostra come, allo stato attuale delle cose, non sia ancora disponibile una strategia per controllare i reservoirs di HIV e quindi per curare in maniera efficace l'infezione.

Come anche descritto da Nitin K Saxena *et al.* nel 2010, nonostante il trattamento di soggetti HIV+ con terapia HAART porti ad un controllo della viremia plasmatica a livelli inferiori alla soglia rilevabile (<40 copie/ml di

plasma), la distribuzione dei farmaci antiretrovirali nei differenti comparti anatomici e cellulari *in vivo* non è uniforme. Ciò porta all'acquisizione da parte di HIV di resistenza a tutte le classi note di farmaci antiretrovirali attualmente prescritte e alla formazione di reservoirs virali *in vivo*. HIV ha quindi il vantaggio particolare di riuscire a sopravvivere nell'ospite mediante la latenza pre e post integrazione.

La latenza post-integrazione è causata da provirus inerti e metabolicamente inattivi che non sono accessibili né al sistema immunitario né ai farmaci; questo stato fornisce ad HIV un riparo sicuro nella cellula ospite e con opportuni stimoli è possibile riattivare uno stadio di latenza virale. Tuttavia, anche se questo meccanismo è stato descritto da molti anni, l'esistenza del reservoir di HIV rimane ad oggi il maggiore impedimento alla sua completa eradicazione. L'esistenza di questi reservoirs e le loro caratteristiche di estrema stabilità rendono irrealistiche le speranze di eradicare il virus con le terapie farmacologiche oggi in uso. E' quindi fortemente sentita l'esigenza di identificare nuovi farmaci in grado di eradicare il virus dai reservoirs in cui si nasconde; inoltre è auspicabile che tali composti siano dotati di una tossicità nulla o inferiore rispetto a quella degli antiretrovirali attualmente noti e che possibilmente non inducano fenomeni di farmacoresistenza.

4. Latenza di HIV-1 e reservoirs virali.

I reservoirs virali possono essere di natura cellulare o anatomica. I reservoirs cellulari a loro volta possono essere classificati in (a) reservoirs che supportano l'infezione latente, (b) reservoirs che supportano l'infezione produttiva e (c) reservoirs extracellulari o carriers virali.

I meccanismi d'azione attraverso i quali una cellula può fungere da reservoir sono molteplici, in ogni caso può essere definita tale solo se il virus archiviato al suo interno è in grado di replicare e se vi persiste per un lungo periodo di tempo.

4.1.a. Reservoirs cellulari che supportano l'infezione latente.

Un reservoir latente consiste in una cellula che ospita in modo stabile al suo interno il genoma virale sottoforma di provirus e che non produce virioni infettanti. Queste cellule sono in grado di trascrivere HIV a bassi livelli trattenendo i trascritti nel nucleo senza tradurli in proteine virali. Pertanto, il virus presente in queste cellule è refrattario alla terapia HAART ed invisibile alla sorveglianza del sistema immunitario; a seguito di stimolazione, tuttavia, queste cellule infettate in modo latente riprendono la produzione di virus che le porta a distruzione per effetto citopatico o apoptosi.

Linfociti T CD4+.

Le cellule memory T CD4+ a riposo costituiscono il reservoir virale latente più cospicuo; l'infezione da HIV in queste cellule può avvenire nel corso della loro attivazione ed espansione clonale; cellule infettate che sopravvivono all'effetto citopatico del virus, alle risposte immunitarie HIV-specifiche ed a contrazione clonale revertano alla quiescenza sottoforma di cellule memory contenenti il provirus silente. Cellule T CD4+ attivate possono anche contrarre l'infezione mentre tornano nello stato di quiescenza; in questo caso esse sono permissive ad HIV ma incapaci di supportarne appieno la replicazione produttiva, sfuggendo così alla HAART e alla sorveglianza immunitaria. Infine, le cellule resting T CD4+ possono infettarsi nel corso dello sviluppo timico o della proliferazione omeostatica a livello periferico, dato che le cellule naive T CD4+ portano DNA virale indipendentemente dal fatto che esse siano CD31+ (di nuova formazione timica) o CD31- (di espansione periferica).

Dati emersi dallo studio di microarray in modelli di latenza in cellule T CD4+ *in vitro* suggeriscono che HIV è in grado di modulare l'espressione genica della cellule ospite per promuoverne la quiescenza, la sopravvivenza e la latenza virale. Inoltre la proteina Tat di HIV promuove la sopravvivenza in macrofagi e microglia mediante attivazione della via PI-3-chinasi/Akt ed il microRNA TAR protegge le cellule infettate in modo latente dall'apoptosi.

Questo tipo di cellule è quindi depleto molto lentamente nel corso della terapia HAART mediante attivazione e successiva morte cellulare; si stima infatti che la

loro emivita sia di circa 44 mesi. Il grado di trascrizione di HIV dipende fortemente dallo stato di attivazione della cellula ospite; quindi il meccanismo attraverso cui si instaura la condizione di latenza è multifattoriale e può essere revertato a seguito della riattivazione della cellula [55].

Microglia.

Le cellule della microglia costituiscono il target principale di HIV nel sistema nervoso centrale (SNC); queste cellule permangono e proliferano nel corso dell'intera esistenza dell'individuo e ciò le rende un reservoir cruciale per HIV. Si ritiene che la loro infezione avvenga nel corso della fase acuta della malattia, proprio quando i valori di viral load sono particolarmente elevati. La replicazione virale al loro interno è silenziata dall'accumulo della proteina CTIP2 ed il virus latente al loro interno si riattiva nel corso delle fasi avanzate della malattia dando luogo ad un nuovo ciclo di infezione caratterizzata da un significativo numero di microglia infettate produttive [55].

Astroцити.

Il meccanismo attraverso il quale HIV riesce a penetrare all'interno degli astroцити non è ancora del tutto compreso, dal momento che queste cellule possiedono i co-recettori CCR5 e CXCR4 ma non il recettore CD4. Si ipotizza pertanto che il recettore per il mannosio costituisca una via alternativa per l'entry di HIV.

Negli astroцити ricavati *post mortem* da tessuti cerebrali di pazienti deceduti per AIDS sono stati individuati sia il DNA che l'mRNA virale; tecniche ad alta sensibilità in grado d'individuare il DNA di HIV hanno dimostrato che il 16-19% degli astroцити sono infetti, dato che risulta correlabile con la loro prossimità ai macrofagi perivascolari e con la severità degli scompensi neurocognitivi. Proteine virali diverse da Nef sono raramente detectate, il che implica che l'infezione negli astroцити non è produttiva; tuttavia gli astroцити, a seguito di stimolazione citochinica, sono in grado di trasmettere il virus alle cellule linfoidi e monocitarie, dando così origine ad un'infezione produttiva [55].

Cellule progenitrici ematopoietiche multipotenti CD34+.

Fauci e collaboratori hanno dimostrato che cellule progenitrici CD34+ derivate dal midollo osseo di pazienti HIV+ in fase avanzata della malattia sono in grado di produrre virus quando vengono co-coltivate con cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC). In un rapporto più recente, Collins e collaboratori hanno evidenziato che HIV infetta le cellule progenitrici ematopoietiche (HPC) sia *in vitro* che *in vivo* e che alcune HPC sono in grado di riprendere l'infezione produttiva a seguito di opportuna stimolazione. Tuttavia, questi risultati mancano di un'adeguata caratterizzazione fenotipica delle cellule progenitrici e la questione è ancora molto dibattuta. La dimostrazione che l'infezione da HIV induce la morte delle HPC e/o interferisce col loro potenziale ematopoietico potrebbe fornire la spiegazione all'assenza di un lineage cellulare carrier di HIV integrato diverso da quello CD4+ [55].

4.1.b. Reservoirs cellulari che supportano l'infezione produttiva.

Questo tipo di reservoir è rappresentato da cellule o distretti anatomici che ospitano stabilmente il provirus integrato in concomitanza ad una replicazione virale attiva. I macrofagi sono i reservoir ideali dato che sono caratterizzati da lunga emivita e sono relativamente resistenti all'effetto citopatico di HIV grazie all'assemblaggio dei virioni all'interno di corpi multivescicolari citoplasmatici. Inoltre HIV ne prolunga la sopravvivenza stessa grazie alla sua attività di up-regolazione dei geni anti-apoptotici.

I macrofagi sono meno sensibili rispetto ad altre cellule ad una grande varietà di agenti antiretrovirali, la cui penetrazione nei distretti anatomici in cui risiedono è limitata; inoltre il virus sequestrato nei corpi multivescicolari può più facilmente eludere la sorveglianza del sistema immunitario grazie alla mancata espressione di antigeni virali sulla superficie cellulare.

I macrofagi diffondono il virus ai linfociti T CD4+ e sono ampiamente distribuiti in tutto l'organismo, compresi gli organi linfoidei primari e secondari, il sistema nervoso centrale e diversi apparati come reni e polmoni. I monociti/macrofagi contenuti nelle secrezioni del tratto genitale e nella placenta hanno anche un ruolo determinante nella trasmissione rispettivamente per via sessuale e

verticale. Inoltre i macrofagi infettati trasferiscono Nef alle cellule B causando l'inibizione delle risposte anticorpali IgG2 ed IgA HIV-specifiche [55].

4.2. Reservoirs extracellulari/ carriers virali.

Questa tipologia di reservoir comprende cellule in grado di trasportare virioni legati alla superficie della loro membrana ma che non supportano la replicazione virale.

A questo gruppo appartengono per esempio le cellule follicolari dendritiche (FDC) che catturano e trattengono antigeni o anche interi virioni grazie alla presenza sulla loro superficie di specifici anticorpi. A differenza del virus reperito in altri distretti, quello associato alle FDC è in grado di replicare, è infettivo anche in presenza di un eccesso di anticorpi neutralizzanti e può persistere in questa condizione per almeno nove mesi. Dal momento che HIV rimane legato alla superficie delle FDC senza infettarle, non è suscettibile alla terapia antiretrovirale. Prima dell'inizio della terapia HAART, le FDC sono sature di virus ed ogni particella virale è trattenuta solo da uno o da pochi complessi immuni che formano quindi interazioni a bassa avidità. In risposta alla terapia HAART il carico virale associato alle FDC decresce con andamento bifasico, con una prima fase di rapida diminuzione che dura circa una settimana seguita da una fase di calo esponenziale più lento che può durare diversi mesi. La spiegazione a tutto ciò potrebbe derivare dal fatto che a seguito della terapia un minor numero di particelle virali compete per il legame ai recettori di superficie delle FDC che formano quindi interazioni più stabili e durature. Questo evidenzia pertanto l'incapacità della terapia HAART nell'eliminare questi reservoirs.

Le cellule follicolari dendritiche risiedono nei centri germinali di tutti i tessuti linfoidei secondari, dov'esse possono interagire con i linfociti T CD4+ attivati; di conseguenza il virus associato alle FDC rappresenta un reservoir che può essere continuamente rifornito con nuovo virus replicante e che può far riesplodere l'infezione quando la terapia viene interrotta.

Analogamente a quanto riportato per le cellule follicolari dendritiche, Fauci e collaboratori hanno dimostrato che HIV si lega alla superficie delle cellule B del

tessuto linfoide e del sangue periferico tramite il recettore CD21 e che può quindi trasmettere l'infezione ai linfociti T CD4+ attivati. La quantità di virus legato alla superficie dei linfociti B decresce anch'essa con la viremia [55].

4.3. Reservoirs anatomici.

I reservoirs anatomici sono distretti riparati dal punto di vista immunologico ed in cui la penetrazione dei farmaci è ridotta; i principali sono il sistema nervoso centrale, gli organi linfatici primari e secondari ed il tratto genitale-urinario.

Sistema nervoso centrale.

Nel sistema nervoso centrale l'infezione si verifica con due differenti modalità: la colonizzazione iniziale di HIV è concomitante con l'infezione sistemica ed è determinata dalla migrazione in questo distretto di linfociti, cellule dendritiche e monociti/macrofagi infetti. Successivamente, durante gli stadi avanzati della malattia, nel SNC si verifica una replicazione auto-sostenuta, mantenuta dai macrofagi infetti residenti, dalla riattivazione sporadica delle cellule del microglia e, in minore misura, dagli astrociti, dai neuroni e dalle cellule endoteliali del microcircolo. I macrofagi infettati e le microglia, inoltre, producono neurotossine virali (gp120, gp41 e Tat) e fattori cellulari (TNF- α , ossido nitrico, citochine, interleuchine e chemochine) che causano l'infiammazione ed il danno neuronale responsabili della demenza HIV-correlata.

Inizialmente, la somministrazione della terapia HAART, nonostante una sua minore concentrazione nei fluidi cerebrospinali (CSF) rispetto al plasma, porta ad un abbattimento dell'HIV RNA in entrambi i comparti, anche se il calo osservato a livello cerebrospinale è significativamente più lento. Tuttavia, ad uno stadio più avanzato della malattia, probabilmente per effetto della concentrazione sub-terapeutica della terapia ARV dovuto alla barriera emato-encefalica, il VL nel CSF è di molto superiore rispetto a quello riscontrato nel plasma e si osserva l'emergere di varianti del virus farmaco-resistenti.

Organi linfoidi.

Il 98% dei linfociti di tutto l'organismo è contenuto nei tessuti linfoidi, di conseguenza, nei pazienti trattati con HAART, l'HIV RNA si concentra maggiormente negli organi linfatici primari (tonsille e midollo osseo) e secondari come il GALT (gut-associated lymphoid tissue), i linfonodi, la milza ed il timo e solo da ultimo nel plasma. Sia il DNA che l'RNA virali possono essere detectati nei linfonodi dopo due anni di trattamento, anche quando il VL nel plasma, nei CSF e nelle secrezioni genito-urinarie non è rilevabile. Nonostante la terapia ARV, HIV è in grado di persistere nel GALT per molti anni e la concentrazione del DNA provirale riscontrata nei linfociti T CD4+ di questo distretto è di molto superiore a quella del sangue periferico. Si stima infatti che $1,2 \times 10^7$ cellule T CD4+ nel GALT portino genomi di HIV replicazione-competenti ma trascrizionalmente silenti e che i livelli di DNA provirale vadano progressivamente crescendo dal duodeno al retto.

Tratto genitale/urinario.

Il testicolo funge da reservoir anatomico di HIV anche nei pazienti sottoposti a terapia HAART, probabilmente a causa del differente grado di penetrazione dei diversi farmaci antiretrovirali attraverso la barriera sangue-testicolo. Il DNA provirale è stato individuato nelle cellule seminali, nei fluidi seminali acellulari, nelle cellule germinali e nella loro progenie; una carica virale residua è inoltre stata trovata nelle secrezioni di uomini in cui la terapia HAART risulta efficace, indicandone la potenziale infettività per via sessuale. Le differenze genotipiche e fenotipiche riscontrate negli isolati seminali ed ematici indicano pertanto una compartimentalizzazione virale nel tratto genitale maschile.

Per quanto concerne l'apparato riproduttivo femminile sono stati isolati nelle biopsie cervicali e nei fluidi cervico-vaginali di donne sottoposte a terapia HAART sia il DNA provirale associato alle cellule che l'RNA libero. Nonostante la maggior parte degli inibitori delle proteasi e degli NRTI penetrino in modo inefficace nei fluidi cervicali, studi filogenetici indicano una mancata compartimentalizzazione virale nel tratto riproduttivo femminile.

In vivo, L'RNA virale è stato riscontrato nelle cellule epiteliali tubulari e glomerulari di pazienti in terapia HAART con problemi renali HIV-associati anche quando il VL plasmatico risultava al di sotto della soglia di rilevazione, indicando la funzione di reservoir anatomico del rene. Sembra infatti che HIV sia in grado di penetrare all'interno di queste cellule attraverso il recettore DEC-205 e di internalizzarsi in compartimenti a basso pH senza stabilire un'infezione produttiva [55].

5. Meccanismi di latenza di HIV.

Per quanto concerne il meccanismo attraverso il quale HIV instaura un'infezione latente nelle cellule T CD4+, l'ipotesi più accreditata è che il virus infetti appena prima del loro ritorno allo stato di quiescenza, come si verifica per le cellule T memory, oppure durante il loro differenziamento timopoietico, come avviene per la popolazione T naive. Considerata la potenza transattivante di Tat e la marcata responsività dei promotori virali a molti segnali di stimolazione cellulare, risulta palese l'esistenza di un contro-mechanismo in grado di reprimere la trascrizione consentendo al virus di instaurare un'infezione permanente non produttiva. Nonostante sia noto che l'espressione dei promotori LTR di HIV viene stimolata da svariati fattori cellulari, per ora si è riusciti ad identificare solo un limitato numero di fattori in grado di down-regolarli [57].

5.1. Deficienza dei fattori cellulari necessari per l'espressione di HIV.

Alcuni aspetti del metabolismo delle cellule resting CD4+ sono cruciali per l'instaurarsi dell'infezione latente. Innanzitutto, le cellule resting scarseggiano di co-attivatori come (NF)- κ B o fattori nucleari delle cellule T attivate (NFAT). L'induzione farmacologica dei fattori di trascrizione e l'attivazione dei TCR forniscono, ad esempio, un segnale molto forte che porta alla ripresa della trascrizione del provirus latente. Per di più, la proteina Tat recluta un complesso trascrizionale che comprende fattori come il P-TEFb (positive transcription elongation factor b). Una riduzione delle concentrazioni intracellulari dei componenti P-TEFb e CycT1, così come l'inibizione di P-TEFb da parte del

complesso HEXIM/7SK RNA sembrano anch'essi responsabili della scarsa trascrizione virale nei linfociti resting. In aggiunta a questo, nelle cellule resting sembrerebbe esistere un disaccoppiamento nel trasporto di mRNA virale, meccanismo che fornirebbe un ulteriore ostacolo all'espressione del provirus in questa popolazione cellulare. Esistono inoltre diverse evidenze a suffragio dell'ipotesi che i microRNA della cellula ospite siano responsabili nell'inibire l'espressione ed la traslocazione dei messaggeri virali [57].

5.2. Interferenza trascrizionale.

Dati recenti hanno dimostrato che interferenze trascrizionali mediate da promotori dell'ospite contribuiscono alla quiescenza di alcuni genomi provirali. Quest'ipotesi deriva dall'osservazione che la maggior parte dei geni virali integrati risiede in introni di geni attivamente trascritti. Pertanto, la continua trascrizione dei geni dell'ospite può fungere da impedimento all'incipiente trascrizione dei promotori LTR di HIV. Questo effetto può risultare negativo quando i geni virali e dell'ospite vengono trascritti in modo convergente, ma potrebbe d'altro canto prevenire la latenza virale e up-regolare l'espressione del provirus integrato se questo possedesse lo stesso orientamento del gene dell'ospite.

Tuttavia, tenendo in considerazione la molteplicità dei siti d'integrazione, i possibili orientamenti e le distanze all'interno dell'ampio spettro dei promotori dell'ospite, risulta molto difficile ipotizzare una strategia traslazionale che tragga vantaggio da questi meccanismi regolatori in grado di eradicare l'infezione latente [57].

5.3. Restrizioni della cromatina.

E' ormai noto da tempo che i fattori trascrizionali sono in grado di influenzare la struttura della cromatina, regolare l'espressione genica ed influenzare la latenza provirale di HIV come riassunto nella Fig. 2. Molte vie di signaling determinano modificazioni enzimatiche covalenti (acetilazione, fosforilazione e metilazione) di aminoacidici specifici in domini di code di istoni [57].

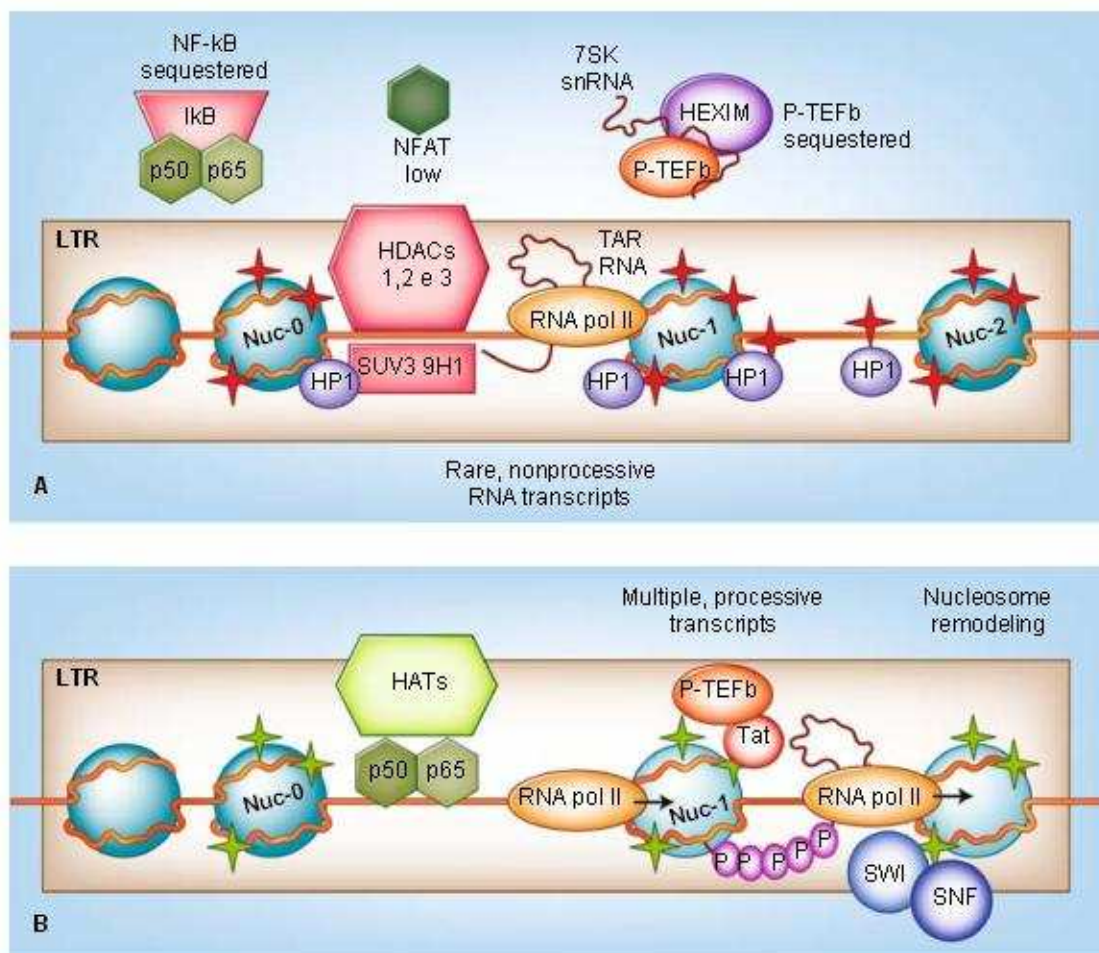


Fig 2. Meccanismi molecolari che favoriscono o limitano l'espressione dell'HIV provirale nelle cellule T quiescenti. A) Le HDACs 1, 2 e 3 (histone deacetylases) (*in rosa*) determinano la deacetilazione dei LTR (long terminal repeats) di HIV che permette il reclutamento delle istone metiltransferasi come SUV39H1 e delle proteine HP1-α. Le metiltrasferasi possono quindi metilare il DNA (*in rosso*). In questo modo alcuni complessi polimerasici possono avviare la trascrizione, anche se questo avviene di rado a causa dei bassi livelli di co-attivatori nucleari come (NF)-κB o NFAT (nuclear factor of activated T cells). La trascrizione che inizia è abortiva e non processiva a causa della mancanza di p-TEFb (positive transcription elongation factor b). **B)** Quando (NF)-κB o NFAT sono disponibili, le HATs (histone acetyltransferase) possono acetilare la cromatina e supportare il reclutamento dei complessi di trascrizione. Man mano che la trascrizione procede, i complessi di rimodellamento dei nucleosomi come SWI/SNF favoriscono successive sessioni di trascrizione. Le prime ondate di trascrizione producono la proteina transattivante di HIV Tat, la quale, in seguito, recluta attivamente il complesso p-TEFb sulla struttura TAR RNA al terminale 5' dell'RNA virale nascente. Questo favorisce la fosforilazione ed attivazione dell'RNA polimerasi (pol) II e di altri fattori, conducendo ad un aumento massivo della trascrizione attiva e ad un'uscita del provirus dal suo stato di latenza. [57]

5.4. Persistenza per via omeostatica.

Di recente è stato proposto un modello completamente nuovo d'infezione persistente all'interno della popolazione T CD4+; tale modello propone che l'infezione provirale non sia completamente stabile ma che in realtà le cellule resting abbandonino il pool delle cellule memory quiescenti e che l'infezione all'interno di questa popolazione sia mantenuta dalla proliferazione omeostatica delle cellule infette [57].

Chromont e colleghi hanno recentemente dimostrato che le cellule T CD4+ della memoria centrale (T_{CM}) e transitoria (T_{TM}) rappresentano i reservoirs principali di DNA provirale integrato nei pazienti HIV+. I loro dati dimostrano che la persistenza virale è mantenuta dalla sopravvivenza delle cellule T e dalla loro scarsa proliferazione antigene-dipendente e che il virus viene depleto molto lentamente nel tempo dalle cellule T_{CM} . Al contrario, nei pazienti aviremici, con valori di CD4+ circolanti più bassi e livelli di proliferazione omeostatica IL-7-dipendente elevati, il DNA provirale viene principalmente riscontrato nelle cellule T_{TM} . Questi dati suggeriscono pertanto che la proliferazione mediata da IL-7 può risultare in una replicazione del genoma provirale senza morte cellulare, favorendo la persistenza di questi reservoirs [58].

SCOPO DELLA TESI

Nonostante gli sforzi compiuti negli ultimi anni per cercare di comprenderla, prevenirla e curarla, l'epidemia da HIV rappresenta tuttora uno dei problemi sanitari più gravi a livello mondiale soprattutto nei Paesi in via di Sviluppo.

Il virus dell'HIV si trasmette essenzialmente per via sessuale o per inoculo di materiale infetto e si è ormai dimostrato che la trasmissione orale per mezzo di secrezioni salivari, genitali o latte materno non è particolarmente efficiente; le limitazioni associate a questa via di trasmissione offrono pertanto interessanti spunti per la messa a punto di nuove forme di prevenzione [7].

L'assenza di casi di contagio per via orale non sono tuttavia legati alla totale assenza di virus nel cavo orale (infatti non è inusuale trovare RNA virale, DNA provirale e cellule infette nei tessuti orofaringei e nelle secrezioni salivari di soggetti sieropositivi) ma sembra piuttosto essere correlata alla presenza di fattori antivirali mucosali endogeni in grado di bloccare l'infezione da HIV-1 attraverso vari meccanismi d'azione.

L'attività antivirale della saliva fu evidenziata già nel 1986 da Patricia Fultz su Lancet, dove si dimostrava come un pre-trattamento di HIV-1 con saliva umana o di scimpanzé fosse in grado di ridurre l'infettività *in vitro* verso i PBMC attivati. Inizialmente si riteneva che i principali responsabili di questa inibizione fossero la Trombospondina-1 e l'SLPI; solo più tardi è stato possibile dimostrare che questa attività antivirale non è ascrivibile interamente a tali fattori e che i peptidi salivari basici ricchi di prolina svolgono un ruolo chiave in quest'effetto. Nel 2001 Robinovitch MR. ha dimostrato che alcune frazioni cromatografiche contenenti preparazioni di PRP basiche umane posseggono attività antivirale contro ceppi HIV-1 Bal e LAI. Nel 2007 Stangler T. descrive invece un peptide artificiale ricco di prolina ottenuto mediante la tecnica della libreria fagica, all'interno del quale è presente una particolare sequenza avente capacità di bloccare il legame tra la proteina Nef di HIV-1 ed il dominio SH3 della proteina Hck delle cellule ematopoietiche inibendo quindi l'infezione.

Scopo di questa tesi è dimostrare per la prima volta che tre peptidi ricchi in prolina, due di origine salivare ed uno di origine sintetica ma di derivazione

salivare, oltre ad inibire l'infezione virale *in vitro* senza indurre effetti tossici sulle cellule mononucleate del sangue periferico, sono in grado di provocare la temporanea stimolazione della replicazione virale favorendo l'eradicazione dei reservoirs virali latenti. Infatti, un aspetto del tutto originale che contraddistingue questi peptidi è la loro capacità di indurre inizialmente la replicazione di HIV per poi inibirla. Questa caratteristica, che di primo acchito potrebbe sembrare un difetto, in realtà costituisce un elemento del tutto innovativo ed originale in quanto potrebbe consentire l'eliminazione dei reservoirs virali latenti e di conseguenza l'eradicazione definitiva del virus dall'organismo.

Oltre all'assenza di citotossicità, che già di per sé li rende particolarmente idonei all'uso terapeutico, questi peptidi hanno una stabilità molto elevata, probabilmente legata alla loro derivazione salivare; com'è noto infatti, nella saliva sono presenti attività enzimatiche che processano la maggior parte delle proteine e probabilmente i peptidi in esame hanno già subito le proteolisi più ricorrenti. A questo si aggiunge la presenza dei residui di prolina che costituisce un fattore protettivo nei confronti delle proteasi più comuni. Questo li rende particolarmente idonei alla somministrazione orale e la loro stabilità consente di limitare il numero di somministrazioni semplificando la posologia.

A queste ultime caratteristiche è da aggiungere anche una buona attività antimicotica, testata in particolare su funghi piuttosto aggressivi e che comunemente affliggono i pazienti immunocompromessi. Questa attività è molto significativa se si considera la problematica associata alle micosi HIV-correlate o in corso di AIDS e consentirebbe il trattamento simultaneo con un unico farmaco dell'HIV e delle infezioni fungine.

Un ultimo aspetto, ma non certo meno importante, è costituito dalla semplicità di sintesi di questi peptidi, che non necessita di strumentazioni sofisticate e che ha una resa particolarmente elevata; questo favorisce una produzione su larga scala a costi contenuti.

MATERIALI E METODI

Sintesi dei peptidi.

I peptidi sono stati assemblati con un Applied Biosystems Peptide Synthesizer 433A (Foster City, CA, USA) su resine precaricanti Proline o Glutamine-2-chlorotritil (Novabiochem, Laufelfingen, CH) seguendo il protocollo Fmoc per la sintesi step-wise dei peptidi in fase solida (1,2). Gli aminoacidi Fmoc-(N α -9-Fluorenilmetilossicarbonil) sono stati ottenuti dalla Novabiochem. Tutti gli attacchi sono stati effettuati con un eccesso di 5 volte di aminoacidi attivati in presenza di 10 equivalenti di N-etildiisopropil-ammina, utilizzando N-[(dimetilamino)-1-H-1,2,3-triazol-4,5-b]piridine-1-ilmetilene]-N-metilmetanaminioesafluoro fosfato N-ossido (HATU, PE Biosystems, Inc., Warrington, UK) come agente per l'attivazione del gruppo carbossilico. La rimozione della protezione temporanea Fmoc del gruppo amminico, è stata ottenuta con piperidina (20%) in dimetilformammide. Alla fine del montaggio della catena peptidica, il peptide è stato scisso dalla resina mediante trattamento con una miscela di 80% di acido trifluoroacetico, 5% di acqua, 5% di fenolo, 5% tioanisolo, 2,5% di etanditiolo e 2,5% triisopropil silano (reagente K, 3) per 3 ore a temperatura ambiente, con contemporanea deprotezione della catena laterale. La resina è stata filtrata e il peptide precipitato a freddo in ter-butilmetil etere. Dopo la centrifugazione e il lavaggio con ter-butilmetil etere, il peptide è stato sospeso in 5% di soluzione acquosa di acido acetico e quindi liofilizzato.

Caratterizzazione dei peptidi salivari.

I peptidi analizzati in questa tesi sono:

- 1) peptide avente SEQ ID NO 1
- 2) peptide avente SEQ ID NO 2
- 3) peptide avente SEQ ID NO 3

Il peptide avente SEQ ID NO 1 e tre ulteriori peptidi suoi frammenti o derivati (SEQ ID 5, 6, 7) sono stati analizzati in modo particolare per l'inibizione della replicazione di HIV in quanto contengono una sequenza GGNK che, secondo lo

stato della tecnica anteriore dovrebbe conferire agli stessi attività inibitoria della α -glicosidasi di HIV.

Sono stati analizzati anche altri due peptidi (SEQ ID 8 e 9), frammenti del peptide avente SEQ ID NO 1, e altri quattro peptidi aventi composizione simile ai peptidi SEQ ID NO 1, 2 e 3 (SEQ ID NO 10, 11, 12 e 13).

Sono stati inoltre studiati 7 peptidi salivari diversamente isolati (SEQ ID NO 1-3; 10-13) e 5 derivati del peptide 1 (SEQ ID NO 5-9). Le caratteristiche generali di questi peptidi sono simili: sono tutti ricchi in prolina e con punto isoelettrico (pI) basico, fatta eccezione per i peptidi aventi SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 11 e SEQ ID NO 12.

	Nome	Mr	Sequenza	pI
1	1932	1932	SEQ ID NO 1	10.0
1a	1-17	1578	SEQ ID NO 5	8.75
1b	1-11	1076	SEQ ID NO 6	8.75
1c	1-17 des pro	1481	SEQ ID NO 7	8.75
1d	1-8	722	SEQ ID NO 8	5.52
1e	12-20	874	SEQ ID NO 9	8.75
2	2733	2733	SEQ ID NO 2	10.0
3	1413	1413	SEQ ID NO 3	9.75
4	1905	1904	SEQ ID NO 10	9.79
5	881	881	SEQ ID NO 11	5.84
6	2166	2166	SEQ ID NO 12	5.88
7	1920	1920	SEQ ID NO 13	9.79

Purificazione dei peptidi.

L'analisi e la purificazione semipreparativa in cromatografia liquida in fase inversa ad alta prestazione (RP-HPLC) è stata effettuata mediante un sistema HPLC Tri-Rotar-VI equipaggiato con un rivelatore multicanale MD-910 per scopi analitici o con un rivelatore variabile UV Uvidec-100-VI per scopi preparativi (tutti JASCO, Tokyo, Giappone). La cromatografia RP-HPLC analitica è stata eseguita con colonna Jupiter C18, 5micron 300A (150 x 4,6 mm, Phenomenex,

Torrance CA, USA). Corse semipreparative in RP-HPLC sono state effettuate con colonna 10 micron 300A C18 Jupiter (250 x 21,2 mm, Phenomenex, Torrance CA, USA). Un gradiente lineare di acetonitrile in acqua/ 0,1% TFA è stato utilizzato per eluire il peptide legato. L'eluato dalle corse semipreparative è stato raccolto in frazioni e le frazioni sono state valutate mediante analisi RP-HPLC. Le analisi di massa MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization/ Time of Flight) sono state eseguite su un Voyager-RP Biospectrometry Workstation (PE Biosystem, Inc.). I valori sperimentali riscontrati per le masse dei peptidi, erano in accordo con i valori calcolati teorici.

1) Atherton E, Sheppard RC (1987) in Udenfriend S and Meienhofer J (eds) The Peptides vol. 9: 1-39, Academic Press, San Diego, CA

2) Fields GB, Noble RL (1990) Int J Peptide Protein Res 35: 161-214

3) King DS, Fields CG and Fields GB (1990) Int J Peptide Protein Res 42: 255-266.

Valutazione della citotossicità su PBMC.

La citotossicità dei peptidi salivari è stata preliminarmente valutata con il test dell'Alamar blue (Biosource International, Inc.), un indicatore redox fluorimetrico impiegato per la valutazione della vitalità cellulare. Quando viene aggiunto al medium di coltura, l'Alamar blue (resazurina) viene ridotto dagli enzimi mitocondriali dando origine ad un prodotto solubile che è direttamente proporzionale al numero delle cellule vitali. Cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di donatori sani sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti alla concentrazione di 1×10^6 /ml in terreno RPMI 1640 supplementato con 10% FBS, 1% glutamina e 20U/ml di interleuchina 2 ricombinante (rIL-2). Dopo 24h di incubazione a 37°C 5% CO₂ le cellule sono state trattate con i peptidi a concentrazioni crescenti da 1 a 20 µg/ml ed incubate per 24h. L'Alamar blue è stato aggiunto a ciascun pozzetto (10%v/v) e la piastra è stata nuovamente incubata a 37°C per 8h. L'assorbanza è stata misurata con un lettore di piastra (Sunrise™, Tecan Group Ltd.) alla doppia lunghezza d'onda di 570 e 600 nm. Come controllo di vitalità cellulare sono stati utilizzati i PBMCs non trattati dei medesimi donatori e ai valori corrispondenti è stato sottratto il

segnale di fondo generato dal solo terreno. L'EC₅₀ è stata calcolata con la formula:

$$\frac{117,216 \times I_{570} - 80,586 \times I_{600}}{117,216 \times T_{570} - 80,586 \times T_{600}} \times 100$$

dove I₅₇₀ e I₆₀₀ sono le assorbanze a 570 e 600 nm dei pozzetti trattati, T₅₇₀ e T₆₀₀ sono le assorbanze a 570 e 600 nm dei pozzetti di controllo non trattati.

Valutazione citofluorimetrica dell'attività pro-apoptotica.

La capacità di indurre apoptosi da parte dei peptidi salivari è stata valutata sulla linea cellulare U937. Le cellule sono state seminate in piastre a 12 pozzetti alla concentrazione di 150.000 cell/ml ed incubate per 24 ore a 37°C; il giorno successivo sono state trattate con i peptidi alle concentrazioni di 1 e 10 µg/ml per 24 ore. Al termine dell'incubazione le cellule sono state prelevate, lavate con PBS 1X e risospese in 200 µl di binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, pH 7.40). Successivamente sono stati aggiunti 5 µl di Annessina V-FITC, come suggerito dalle istruzioni del kit e 5 µl di propidio ioduro alla concentrazione di 1 mg/ml (20 µg/ml finale). Dopo un'incubazione di 10 minuti a temperatura ambiente, la sospensione è stata portata a volume di 0,6 ml con binding buffer e letta al citofluorimetro (Beckman Coulter FC 500 CXP).

Valutazione ex vivo dell'attività inibitoria su HIV-1.

I PBMC di pazienti naive HIV-1 R5 positivi, caratterizzati da un'elevata carica virale a livello plasmatico ed in fase di infezione acuta, sono stati coltivati a 37°C al 5% di CO₂, in una piastra a 96 pozzetti alla concentrazione di 1X10⁶/ml in medium RPMI 1640 supplementato con FBS al 10%, glutamina all'1% e rIL-2 (20U/ml). La rIL-2 (20U/ml) è stata aggiunta alla coltura ogni 3-4 giorni. Le cellule sono state trattate al tempo zero con i peptidi salivari alla concentrazione di 1 e 10 µg/ml per tutto il tempo della coltura. La produzione di virus è stata valutata nei surnatanti di coltura ai giorni 5 e 10 mediante il saggio p24 ELISA Ultrasensitive (Perkin Elmer Life Sciences, Inc. Boston).

Valutazione *in vitro* dell'attività inibitoria su HIV-1 dei peptidi salivari e dei loro frammenti.

I PBMC di tre donatori sani, purificati mediante centrifugazione su gradiente (Percoll™, GE Healthcare Life Sciences), sono stati miscelati in un pool e coltivati in terreno RPMI 1640 supplementato con 10% di FBS, 1% di glutamina e 1% di Penicillina/Streptomicina. Prima dell'infezione (m.o.i. 0,5) con i ceppi HIV BaL (R5) e HIV IIIB (X4), le cellule sono state stimulate con PHA (5 µg/ml) e rIL-2 (20 U/ml) per 24 ore. L'infezione è stata eseguita seguendo due differenti protocolli sperimentali: a) i PBMC sono stati infettati per due ore, lavati due volte con PBS 1X e coltivati in una piastra a 96 pozzetti alla concentrazione di 10^6 cell/ml per 12 giorni in presenza di 10 µg/ml di peptide. I peptidi salivari (10 µg/ml) e l'rIL-2 (20 U/ml) sono stati dispensati nei pozzetti ogni 4 giorni; b) i PBMC sono stati pre-incubati a 37°C, 5% CO₂ per 2 ore con i peptidi salivari (10 µg/ml), infettati per 2 ore con HIV-1, lavati due volte con PBS 1X e seminati in una piastra a 96 pozzetti alla concentrazione di 10^6 cell/ml per 12 giorni. rIL-2 (20 U/ml) è stata aggiunta ai pozzetti ogni 4 giorni.

Il saggio è stato eseguito in triplicato. La produzione di virus è stata valutata dopo 8 e 12 giorni di infezione nei surnatanti di coltura mediante il saggio p24 ELISA Ultrasensitive (Perkin Elmer Life Sciences, Inc. Boston).

Lo stesso protocollo sperimentale è stato utilizzato anche per la valutazione dell'attività antivirale di frammenti più piccoli dei peptidi salivari studiati.

Valutazione della formazione dei sincizi.

Le linee cellulari CHO33T, HeLa ADA e HeLa LAI, che esprimono costitutivamente sulla loro superficie la glicoproteina gp120 di HIV, sono state seminate in piastre a 6 pozzetti alla concentrazione di 250.000 cell/pozzetto e coltivate per 24 ore in terreno D-MEM high glucose supplementato con 10% di FBS, 1% di glutamina, 1% di Penicillina/Streptomicina e 1% di sodio piruvato. Il G418 (100 µg/ml) è stato addizionato al terreno di coltura della linea CHO33T.

Le cellule CD4+ di tre donatori sani, isolate per deplezione con il CD4+ T Cell Isolation Kit II human (Milenyi Biotec Inc.), sono state miscelate in pool e co-coltivate con le linee cellulari CHO33T, HeLa ADA e HeLa LAI in piastre a 6

pozzetti in terreno RPMI 1640 completo alla concentrazione di 10^6 cell/ml in presenza dei peptidi salivari. Le cellule non trattate con i peptidi salivari sono state utilizzate come controllo. La formazione dei sincizi è stata osservata dopo 18 ore di co-cultura.

Valutazione della localizzazione cellulare in microscopia confocale.

I peptidi salivari sono stati coniugati con cianina-3 utilizzando il Cyanine 3-NHS ester pack (Enzo Life Sciences International, Inc., USA).

Le cellule della linea HeLa sono state seminate in chamber-slides da 8 pozzetti alla concentrazione di 25.000 cell/pozzetto e coltivate a 37°C 5%CO₂ per 24 ore in terreno D-MEM supplementato con 10% di FBS, 1% di glutamina, 1% di Penicillina/Streptomicina. Sono state allestite tre chamber-slides rispettivamente per i tempi: 30 min, 1 ora e 3 ore.

Il giorno seguente è stato aspirato il terreno dai pozzetti dalle chamber-slides e sostituito con D-MEM senza FBS addizionato con 10 µg/ml di peptidi salivari coniugati con la cianina 3 (Cy3). Dopo 30 minuti di incubazione a 37°C, 5% CO₂ i pozzetti sono stati lavati 2 volte con PBS 1X pre-riscaldato a 37°C. Dalla prima chambre-slide è stata rimossa la struttura perimetrale ed il vetrino è stato fissato con p-formaldeide al 4% per 30 minuti a RT. Nelle altre due chambre-slides è stato aggiunto terreno fresco senza FBS e si è proseguito con l'incubazione rispettivamente per i restanti 30' minuti e 2,30 ore, poi si è proceduto come per la chambre-slide esposta per 30 minuti (vedi sopra).

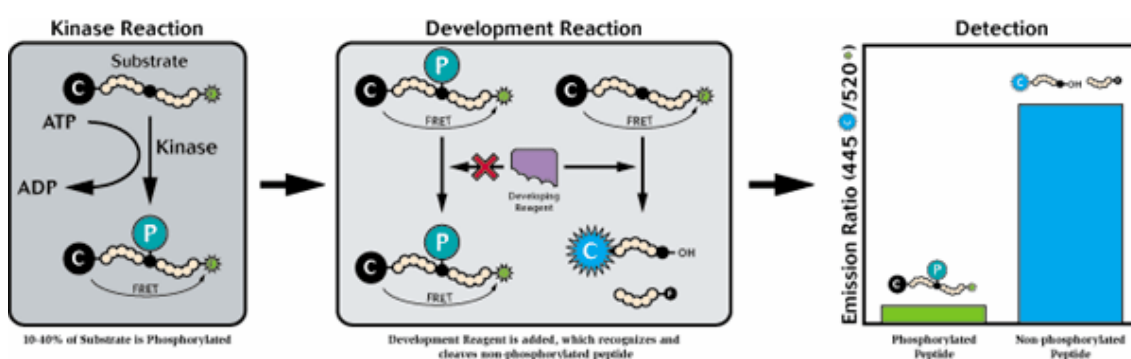
Una volta terminata la fissazione, i vetrini sono stati lavati cinque volte con PBS 1X. Per spegnere l'autofluorescenza i vetrini sono stati incubati con la soluzione GDB 1X per 1 ora, lavati 2 volte con tampone HS, una volta con tampone LS ed una volta con acqua.

Infine il vetrino coprioggetto è stato montato con il ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen s.r.l.). I vetrini sono stati conservati al buio a 4°C fino per pochi giorni ed analizzati col microscopio confocale a scansione laser LSM 510 (Carl Zeiss s.p.a.).

Valutazione dell'inibizione dell'attività Tirosin-chinasica (hck).

Attualmente sono in corso alcuni esperimenti che hanno lo scopo di evidenziare se i peptidi salivari studiati sono in grado di inibire l'attività tirosin-chinasica delle proteine hck e quindi se tali proteine costituiscono il target molecolare mediante cui si esplica l'attività antivirale. A tale fine viene impiegato lo Z'-LYTE™ Kinase Assay Kit-Tyr 2 Peptide Protocol (Invitrogen Corporation).

Questo saggio biochimico utilizza la tecnologia FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) tra cumarina e fluoresceina per la rilevazione del segnale ed è basato sulla differente sensibilità all'attività proteolitica dei peptidi sintetici fosforilati e non. Il peptide substrato è marcato con due fluorofori, uno a ciascuna delle due estremità, che costituiscono un accoppiamento FRET. Nella reazione primaria (reazione chinasica), la chinasi trasferisce il γ -fosfato dell'ATP al residuo tirosinico del peptide sintetico che funge da substrato. Nella reazione secondaria (reazione di sviluppo), una proteasi sito-specifica riconosce e taglia i peptidi non fosforilati. Questo taglio distrugge l'accoppiamento FRET tra fluoroforo donatore (cumarina) ed accettore (fluoresceina) sul peptide sintetico; ciò invece non avviene per i peptidi fosforilati che, non venendo tagliati, conservano l'accoppiamento FRET.



Il segnale di reazione viene quantificato con metodo raziometrico, calcolando il rapporto (Emission Ratio) tra emissione del donatore e dell'accettore dopo eccitazione del fluoroforo donatore alla lunghezza d'onda di 400 nm.

$$\text{Emission Ratio} = \frac{\text{Coumarin Emission}_{445 \text{ nm}}}{\text{Fluorescein Emission}_{520 \text{ nm}}}$$

In questo modo i segnali prodotti da entrambi i peptidi (tagliati e non) contribuiscono al segnale di fluorescenza; l'Emission Ratio rimane quindi basso se il peptide FRET viene fosforilato (in assenza di inibizione della chinasi) ed aumenta se il peptide FRET non viene fosforilato (quando la chinasi viene inibita dal composto in esame).

Il grado di fosforilazione di ciascun campione viene calcolato in rapporto ai controlli di fosforilazione (0% e 100%) mediante la seguente formula:

$$\% \text{ Phosphorilation} = 1 - \frac{(\text{Emission Ratio} \times F_{100\%}) - C_{100\%}}{(C_{0\%} - C_{100\%}) + [\text{Emission Ratio} \times (F_{100\%} - F_{0\%})]}$$

Dove:

$C_{100\%}$ = valore medio dell'emissione della cumarina del controllo 100% di fosforilazione

$C_{0\%}$ = valore medio dell'emissione della cumarina del controllo 0% di fosforilazione

$F_{100\%}$ = valore medio dell'emissione della fluoresceina del controllo 100% di fosforilazione

$F_{0\%}$ = valore medio dell'emissione della fluoresceina del controllo 0% di fosforilazione

La qualità del saggio viene invece valutata mediante il calcolo del fattore Z', dove un valore maggiore o uguale a 0,5 ne identifica l'eccellenza. Tale fattore si calcola in tre fasi successive:

1. calcolo dell'Emission Rate per ciascun pozzetto;
2. calcolo della media e deviazione standard dei ratio di ciascuna fila di pozzetti;
3. calcolo del fattore Z' con la seguente formula:

$$Z'\text{-Factor} = 1 - \frac{(3 \times \sigma_{100\% \text{ inibizione}}) + (3 \times \sigma_{0\% \text{ inibizione}})}{\mu_{100\% \text{ inibizione}} - \mu_{0\% \text{ inibizione}}}$$

Il saggio viene condotto in due fasi come indicato dal produttore. Nella prima fase si eseguono delle diluizioni seriali della chinasi al fine di calcolarne la concentrazione ottimale di utilizzo, che è rappresentata dalla concentrazione che è in grado di fosforilare il 20-40% del peptide substrato in 1h a RT.

Nella seconda fase, quella di screening vero e proprio, vengono saggiati i peptidi salivari SEQ ID NO 1, 2 e 3 alla concentrazione di 10 µg/ml ed il segnale

FRET viene misurato con un fluorimetro ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 400nm ed alla doppia lunghezza d'onda di emissione di 445 nm e 520 nm.

RISULTATI

I saggi di citotossicità condotti con il metodo colorimetrico dell'Alamar blue su PBMC di donatori sani indicano che tutti i peptidi salivari possono essere impiegati senza indurre effetti tossici a concentrazioni crescenti fino a 20 µg/ml; infatti, la percentuale di cellule vitali nei campioni trattati a tale concentrazione è sovrapponibile a quella del controllo non trattato (93% contro 95%) (Fig. 3).

Questi dati sono stati confermati mediante analisi citofluorimetrica con Annessina V e Ioduro di propidio sulla linea cellulare U937, un saggio che consente di discriminare con precisione le cellule vitali da quelle apoptotiche e necrotiche. In citofluorimetria, infatti, si osserva che a 20 µg/ml non si hanno effetti di induzione dell'apoptosi o della necrosi e che la quasi totalità delle cellule si presenta vitale (Fig. 4).

I saggi di replicazione *ex vivo*, condotti su cellule di pazienti infetti caratterizzati da alti livelli di HIV-RNA circolante, mostrano chiaramente come il trattamento con i peptidi aventi SEQ ID 1, 2 e 3 sia in grado di indurre già dopo 5 giorni un significativo aumento della replicazione virale, non osservato invece nei campioni trattati con gli altri peptidi salivari (paragonabili al controllo); le concentrazioni di antigene p24 misurate nei campioni trattati con i peptidi SEQ ID 1, 2 e 3 risultano infatti di gran lunga superiori a quelle del controllo. Questa concentrazione, tuttavia, tende a calare progressivamente fino al raggiungimento, al decimo giorno, di valori del tutto sovrapponibili al controllo (Fig. 5). La capacità di questi tre peptidi di stimolare *ex vivo* la replicazione virale sottolinea il loro potenziale impiego come principi attivi anti-reservoirs, in grado di stimolare, *in primis*, la replicazione del virus latente e, successivamente, di inibirla in maniera efficace.

Infatti, nei saggi di infezione *in vitro*, eseguiti infettando PBMC di donatori sani con il ceppo IIIB di HIV, i peptidi aventi SEQ ID 1, 2 e 3 mostrano un rilevante effetto di inibizione della replicazione virale già dopo 8 giorni di coltura e nei campioni trattati con i peptidi SEQ ID 2 e 3 tale effetto si conserva inalterato fino al dodicesimo giorno di coltura (Fig. 6). Questi risultati si confermano in tutti gli esperimenti di inibizione *in vitro* condotti seguendo i due diversi protocolli di

infezione e trattamento delle cellule. Un comportamento analogo si verifica anche nei saggi *in vitro* condotti impiegando il ceppo BaL di HIV; in particolare, il peptide SEQ ID 2 risulta essere un efficace inibitore della replicazione virale a 12 giorni (Fig. 7) indipendentemente dal protocollo sperimentale applicato.

Al contrario, il peptide SEQ ID 1 possiede una costante attività inibitoria se impiegato dopo l'infezione e somministrato alla coltura ogni quattro giorni ma è inefficace nell'inibire la replicazione virale in cellule pre-trattate e successivamente esposte ad HIV BaL.

Quando, tuttavia, i medesimi esperimenti vengono condotti con i peptidi aventi SEQ ID 5, 6, 7, 8, 9, cioè dei frammenti più piccoli del peptide SEQ ID 1, l'attività antivirale viene meno ed i campioni trattati con questi frammenti hanno concentrazione di antigene p24 paragonabili ai controlli non trattati. Questi dati indicano chiaramente che quanto precedentemente riportato da alcuni autori circa la funzione inibitoria della sequenza GGNK sull'enzima α -glicosidasi di HIV-1 non è plausibile. Infatti, nonostante tutti i peptidi esaminati contengano almeno parzialmente la sequenza in questione, la sola presenza di questa non è sufficiente perché si espliciti l'attività antivirale e l'effetto inibitorio sulla replicazione di HIV-1 è probabilmente legato all'intera sequenza aminoacidica del peptide ID1 e alla sua configurazione tridimensionale.

Per verificare se l'effetto antivirale osservato *in vitro* potesse essere imputabile all'inibizione del legame tra il recettore CD4 linfocitario e la glicoproteina virale gp120, sono stati eseguiti dei saggi di formazione dei sincizi condotti mediante co-coltura di linfociti CD4+ umani con le linee cellulari HeLa ADA e HeLa LAI che esprimono costitutivamente la gp120 di HIV sulla loro superficie. In questi esperimenti è stata osservata la formazione di sincizi già dopo 18 ore di co-coltura sia nei controlli non trattati che nei campioni trattati con 20 μ g/ml dei peptidi aventi SEQ ID 1, 2, 3. Questi dati indicano pertanto che il meccanismo attraverso cui si esplica l'inibizione osservata *in vitro* non comporta un blocco del legame di HIV al suo recettore cellulare di superficie e conseguentemente dell'entry.

A questo punto, per meglio comprendere dove fosse localizzato il target farmacologico dei tre peptidi, sono stati condotti degli esperimenti in

microscopia confocale per valutarne il posizionamento nella cellula trattata. Le osservazioni, eseguite sulla linea cellulare HeLa dopo 30 minuti, 1 e 3 ore di incubazione indicano chiaramente che già 1h è sufficiente perché i peptidi attraversino la membrana cellulare e si localizzino nel citoplasma in prossimità del nucleo (Fig. 7) e ciò fa supporre che l'inibizione di HIV-1 avviene dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite.

Alla luce di queste ultime riflessioni e dei dati già presenti in letteratura [59], dove è stato dimostrato che un peptide sintetico ricco di prolina è in grado di inibire il legame tra la proteina Nef di HIV ed il dominio SH3 (Src Homology 3) della proteina chinasi Hck (Hemopoietic cell kinase), sono in fase di realizzazione esperimenti volti a valutare l'effettiva interazione tra i peptidi salivari studiati e le proteine Hck mediante analisi FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).

Le proteinchinasi costituiscono uno dei principali bersagli dell'attività di Nef ed i membri della famiglia delle proteine Src sono strettamente collegati al suo funzionamento. Vari reports hanno dimostrato che Nef interagisce con domini SH3 dei membri della famiglia delle proteine Src espressi nei target cellulari di HIV, tra cui Fyn, Hck, Lck, Lyn e c-Src. Tra queste, l'interazione della proteina Nef con le Hck è stata studiata in modo approfondito sia dal punto di vista cellulare che molecolare. Hck è fortemente espressa nelle cellule monocito/macrofagiche che fungono da target cellulari e reservoirs virali fondamentali per HIV. Studi in cristallografia ai raggi X hanno dimostrato che Nef interagisce con il dominio SH3 delle proteine Hck attraverso un meccanismo che dipende dal ripiegamento tridimensionale di Nef. I punti di contatto di questa interazione comprendono motivi PXXPXR di Nef altamente conservati che formano l'elica poliprolinica di tipo II tipica dei ligandi per SH3 [60].

I dati risultanti dalle analisi FRET possono pertanto fornire indicazioni a conferma del meccanismo d'azione ipotizzato così come esperimenti di trasfezione della proteina Nef in cellule TF-1 possono validarlo a livello biologico. E' infatti noto che l'attività proliferativa della linea TF-1 è strettamente dipendente dalla presenza in coltura di fattori di crescita quali il GM-CSF o IL-3

e che tale dipendenza viene persa in presenza della proteina virale Nef [61]. Se i peptidi salivari studiati bloccassero effettivamente l'attività di Nef, la proliferazione delle cellule TF-1 trasfettate si arresterebbe poiché ritornerebbero ad essere fattore di crescita dipendenti.

Un metodo alternativo alla trasfezione per valutare l'interazione tra i peptidi salivari e la proteina virale Nef può essere anche la co-coltura di cellule TF-1 con monociti e macrofagi infettati con il ceppo HIV BaL espanso su blasti stimolati con PHA. Prendendo infatti dei PBMC di donatore e coltivandoli in piastra per alcuni giorni è possibile ottenere una coltura di macrofagi adesa al fondo del pozzetto. Infettando poi questi macrofagi con HIV BaL e co-coltivandoli con le cellule TF-1 è possibile trasmettere l'infezione, e quindi anche la proteina Nef, alla linea cellulare. In questo modo la proliferazione delle cellule TF-1 diventa GM-CSF e IL-3 indipendente e la condizione d'origine dovrebbe poter essere ripristinata grazie all'effetto inibitorio esercitato dai peptidi salivari nei confronti di Nef.

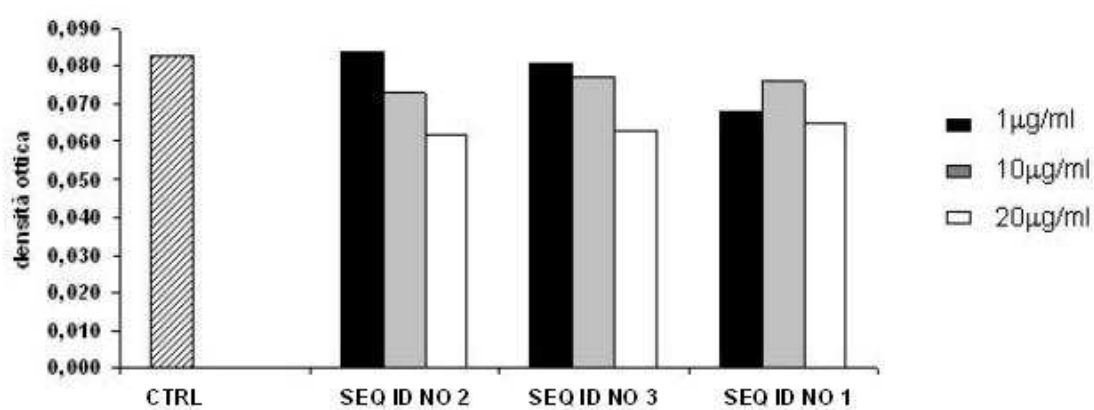


Fig. 3 Test di citotossicità con Alamar blue. Valori di densità ottica dopo 24h di trattamento.

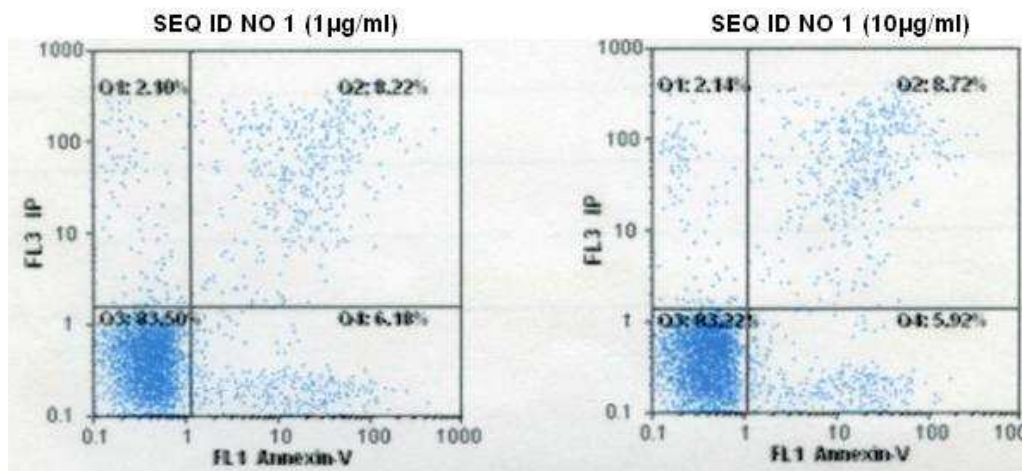


Fig. 4 Valutazione dell'attività pro-apoptotica. Valutazione in citofluorimetria a flusso mediante marcatura con Annessina V e Propidio Ioduro dell'attività citotossica del peptide SEQ ID NO 1 alle concentrazioni di 1 e 10 µg/ml.

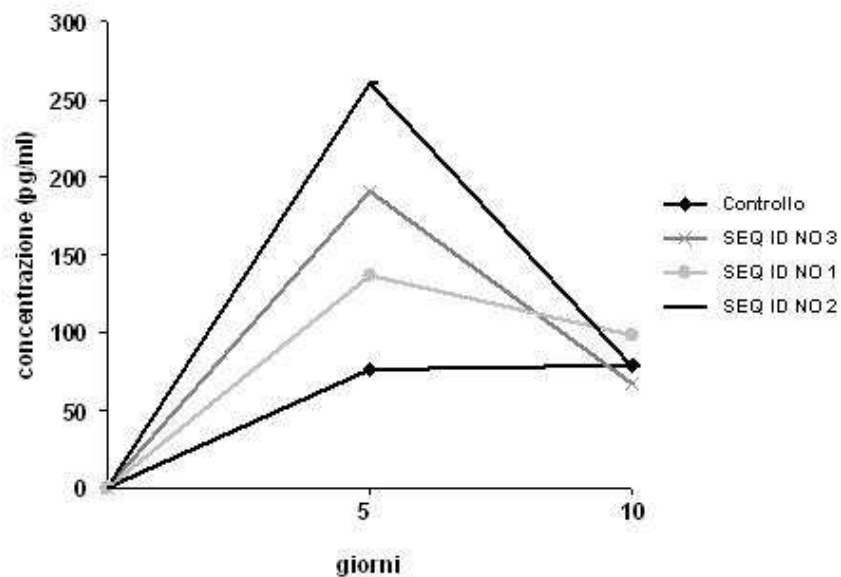


Fig. 5 Saggio di proliferazione *ex vivo*. Concentrazione dell'antigene virale p24 ai giorni 5 e 10 di coltura.

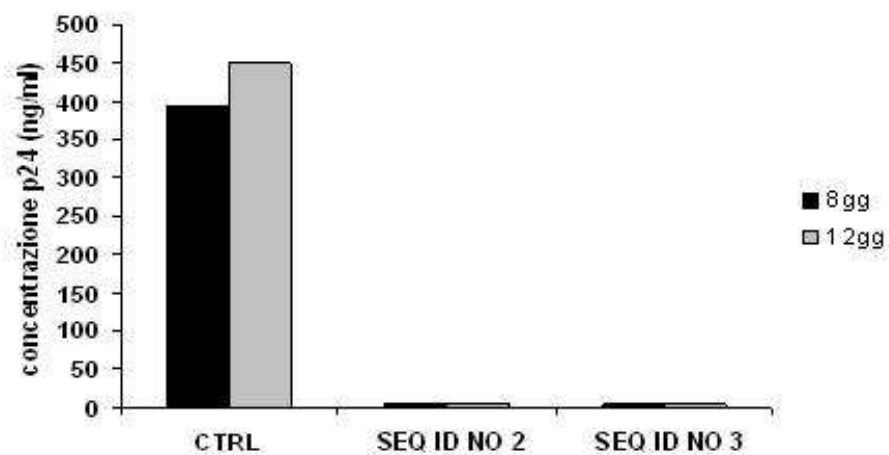


Fig. 6 Infezione *in vitro* con HIV-1 IIIB. Concentrazione dell'antigene virale p24 ai giorni 8 e 12 di coltura.

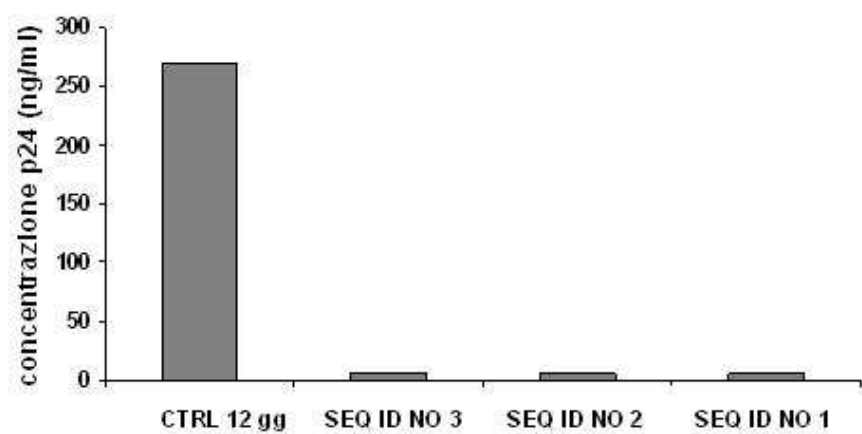


Fig. 7 Infezione *in vitro* con HIV-1 BaL. Concentrazione dell'antigene virale p24 al dodicesimo giorno di coltura.

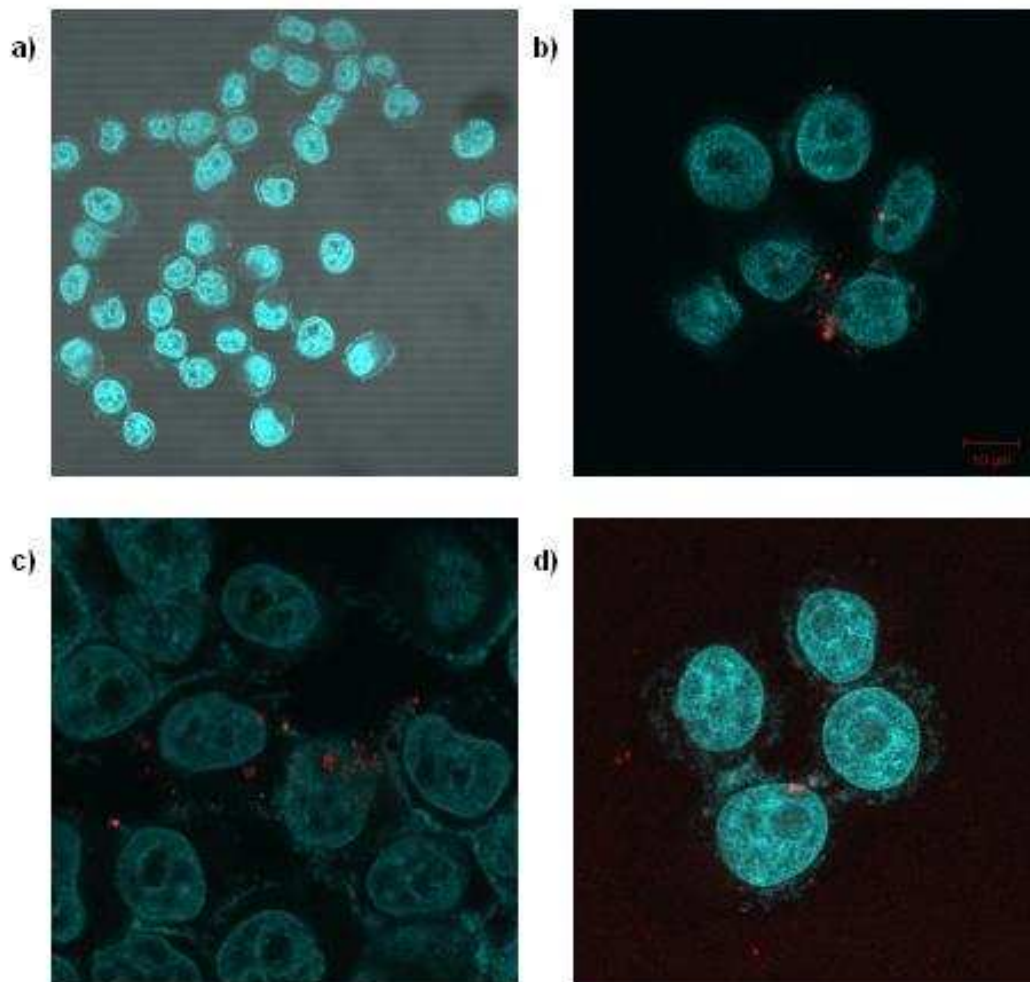


Fig. 8. Localizzazione cellulare dei peptidi salivari. L'immagine mostra la localizzazione intracellulare pericitoplasmatica dei peptidi salivari dopo tre ore di incubazione ad un ingrandimento 63X. L'esperimento è stato condotto sulla linea cellulare HeLa. I nuclei cellulari sono stati colorati con DAPI mentre i peptidi sono stati marcati con cianina-3 (Cy3); le immagini sono state acquisite col microscopio confocale a scansione laser LSM 510 (Carl Zeiss s.p.a.). **a)** HeLa di controllo non trattate; **b)** localizzazione del peptide SEQ ID NO 1; **c)** localizzazione del peptide SEQ ID NO 3; **d)** localizzazione del peptide SEQ ID NO 2.

DISCUSSIONE

E' cosa ormai nota da tempo che l'infezione da HIV praticamente non si trasmetta per via orale come era stato provocatoriamente asserito da Aiuti nel 1991 col suo bacio a Rosaria Iardino. Da allora diversi studi epidemiologici hanno ampiamente documentato l'assenza di casi di contagio per questa via attribuendola non tanto alla totale assenza di virus nel cavo orale, quanto a specifici fattori salivari e mucosali in grado di inibire l'infezione. Nonostante la saliva possa essere raccolta facilmente con metodi non invasivi, gli studi inerenti la sua composizione sono particolarmente complessi a causa della sua variabilità inter- e intra- individuale e dal suo comportamento dinamico. Infatti, le proteine salivari sono altamente polimorfe e subiscono estese modificazioni post-traduzionali prima, durante e dopo la secrezione ad opera di enzimi di origine endogena ed esogena (della microflora). Anche se tra i generi non sono emerse differenze significative nella composizione del proteoma salivare, sono state invece osservate variazioni particolarmente rilevanti correlate all'età, soprattutto pediatrica [62]. Negli anni sono stati isolati dalla saliva molti fattori antivirali con i meccanismi d'azione più vari; tuttavia, è stato anche documentato che nessuno di questi è in grado, da solo, di inibire completamente il virus. In due differenti studi, Robinovitch MR. e Stangler T. hanno dimostrato l'attività antivirale di proteine basiche ricche di prolina (PRP) umane ed artificiali aventi capacità di bloccare il legame tra la proteina Nef di HIV-1 ed il dominio SH3 della proteina Hck delle cellule ematopoietiche inibendo quindi l'infezione.

In questa tesi vengono descritti, per la prima volta, tre peptidi salivari ricchi in prolina, due di origine naturale ed uno sintetico ma di derivazione salivare, che, oltre ad inibire l'infezione da HIV *in vitro* senza indurre effetti tossici sulle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), sono in grado di provocare la temporanea stimolazione della replicazione virale.

Questi peptidi ricchi in prolina sono stati isolati rispettivamente da saliva umana (SEQ ID NO 1, peptide di peso molecolare 1932 Da), e da saliva di maiale

(SEQ ID NO 2, peptide di peso molecolare 2733 Da). Un terzo, avente SEQ ID NO 3 e di peso molecolare 1413 Da, è una variante non presente in natura di un peptide salivare suino di 1511 Da isolato da granuli di secrezione di maiale e presente nella sequenza delle basic-proline-rich protein Q95JC9 di *Sus scrofa*. La struttura del peptide avente SEQ ID NO 1 è presente in modo ripetitivo anche nella sequenza delle due pro-proteine umane denominate Basic salivary proline-rich protein 1 e Basic salivary proline-rich protein 2 (nota anche come Con1 glycoprotein). La stessa struttura è inoltre contenuta nella sequenza 753-768 della msp1 (merozoite surface protein-1) di *Plasmodium coatneyi* mentre la sequenza NO 2 è presente nella struttura delle isoforme 2 e 3 della basic proline-rich protein isolate da *Sus scrofa* (Q95JC9-2, -3).

I peptidi di 1932 e 2733 Da sono stati originariamente isolati e purificati per via cromatografica rispettivamente da saliva umana intera (prevalentemente di secrezione parotidea) e da granuli di secrezione della ghiandola parotidea del maiale. Il peptide avente SEQ ID NO 3 è invece un prodotto di sintesi. Tutti e tre i peptidi sono caratterizzati da un alto contenuto di residui di prolina (45% per la SEQ ID NO 1, 68% per la SEQ ID NO 2 e 75% per la SEQ ID NO 3) e sono dotati di uno spiccato carattere basico.

I peptidi descritti sono stati valutati per l'attività di inibizione della replicazione di HIV-1 in modelli sperimentali di infezione endogena *ex vivo* ed esogena *in vitro*. Questi tre peptidi salivari, in particolar modo il peptide avente SEQ ID NO 1, hanno dimostrato di possedere una sorprendente ed inattesa capacità non solo di inibire la replicazione virale in cellule infettate *in vitro* con ceppi R5 ed X4 di HIV-1, ma anche di indurre la replicazione virale in esperimenti *ex vivo* condotti impiegando cellule di pazienti HIV sieropositivi ad elevato viral load. Questa iniziale induzione della replicazione virale in cellule in cui HIV è presente in forma latente seguita subito dopo da inibizione è particolarmente interessante, in quanto, sostanze in grado di attivare la replicazione virale sono state proposte come adiuvanti della terapia per la loro capacità di prevenire la formazione di reservoirs latenti o di eliminare quelli pre-esistenti consentendo l'eradicazione definitiva del virus dall'organismo. Infatti, la persistenza di reservoirs virali latenti costituisce ad oggi una delle problematiche ancora

irrisolte della cura all'infezione da HIV nonché l'oggetto di studio principale della ricerca farmacologica di questi ultimi anni.

Lo studio mediante dicroismo circolare e spettroscopia all'infrarosso ha evidenziato che i tre peptidi presentano una struttura secondaria mista costituita da un motivo random coil e poliprolina-II; queste caratteristiche strutturali suggeriscono una loro potenziale interattività con domini proteici di tipo SH3, WW, GYF, EVH1, come anche dimostrato da esperimenti "in silico" con il software on-line iSPOT (<http://cbm.bio.uniroma2.it/ispot/>) (dati non riportati). Queste evidenze fanno pertanto ipotizzare, come riportato anche da Stangler, che l'azione anti-reservoir dei peptidi salivari potrebbe essere determinata da un'interazione strutturale con la subunità SH3 delle protein chinasi Hck che ne ostacolerebbe il legame con la proteina virale Nef. Si sa infatti che Nef non ha funzioni catalitiche e che promuove la patogenicità di HIV alterando le vie di signaling delle cellule infettate mediante il suo legame alle proteine intracellulari. Grazie a questa interazione, Nef è in grado di alterare diversi processi cellulari favorendo così la replicazione virale, l'evasione dalla sorveglianza immunologica ed incrementando la sopravvivenza del virus nelle cellule T e nei macrofagi.

Inoltre, i tre peptidi salivari in questione mostrano una citotossicità molto ridotta che li rende idonei all'utilizzo terapeutico ed una significativa attività antimicotica (dati omessi), particolarmente utile nel trattamento dell'infezione da HIV e/o dell'AIDS, dal momento che i pazienti affetti da immunodeficienza acquisita sono soggetti a contrarre di frequente infezioni causate da funghi opportunisti altamente patogeni.

In aggiunta a tutte le caratteristiche elencate, va sottolineato che questi peptidi si contraddistinguono per l'elevata stabilità, probabilmente dovuta alla loro origine salivare; i risultati *in vitro* dimostrano in effetti che l'attività dei peptidi in coltura rimane inalterata per almeno 4 giorni. Com'è noto, nella saliva sono presenti svariate proteasi ed è ragionevole ritenere che i peptidi in questione abbiano già subito i processi proteolitici più ricorrenti; inoltre, l'elevato contenuto di residui di prolina rappresenta un ulteriore fattore protettivo nei confronti delle proteasi più comuni.

I peptidi qui descritti presentano perciò un insieme eccezionale di caratteristiche che li rendono candidati ideali per la terapia delle infezioni da HIV, l'eliminazione dei reservoirs latenti ed il trattamento delle micosi AIDS-correlate. La loro stabilità è infatti una caratteristica molto interessante in molecole ad uso farmacologico in quanto permette di limitare il numero di somministrazioni e la loro derivazione salivare, in aggiunta ai processi proteolitici già subiti da parte degli enzimi salivari, li rende particolarmente idonei ad una somministrazione anche per via orale. Inoltre, data la loro bassissima tossicità, le composizioni contenenti uno dei tre peptidi o un cocktail di essi potrebbero essere utilizzate, oltre che a scopo terapeutico, anche come profilassi per tutti quei soggetti esposti all'infezione da HIV, quali operatori medici e partner di soggetti infetti.

Le potenzialità appena descritte sono assolutamente peculiari e non ascrivibili ad altri peptidi che presentano le caratteristiche generali dei peptidi aventi SEQ ID NO 1, 2, e 3. Infatti, sono stati saggiati, unitamente a questi tre, altri peptidi analoghi, aventi composizione simile, o loro frammenti, che non hanno dimostrato di condividere le caratteristiche dei tre peptidi in esame.

Il peptide avente SEQ ID NO 1 e tre ulteriori peptidi suoi frammenti o derivati (SEQ ID 5, 6, 7) sono stati analizzati in modo particolare per l'inibizione della replicazione di HIV in quanto contengono una sequenza GGNK che, secondo lo stato della tecnica anteriore, avrebbe dovuto conferire loro un'attività inibitoria sulla α -glicosidasi efficace nella cura dell'HIV. In questo caso, l'attività antivirale osservata risulta essere esclusiva del peptide NO 1 e non condivisa dai suoi tre frammenti; pertanto tale attività non può essere in alcun modo imputata alla presenza del motivo GGNK all'interno della sequenza aminoacidica.

Sono stati analizzati anche due peptidi (SEQ ID NO 8 e 9), frammenti del peptide avente SEQ ID NO 1, e altri quattro (SEQ ID NO 10, 11, 12 e 13) con composizione simile ai peptidi aventi SEQ ID NO 1, 2 e 3. Nonostante le analogie strutturali, i peptidi similari non influiscono in alcun modo sul livello di espressione dell'antigene virale p24 e non presentano nessuna delle attività sopra elencate.

Da un punto di vista applicativo la sintesi di questi peptidi è relativamente semplice e non necessita dell'ausilio di particolari strumentazioni. La tecnica di

sintesi su fase solida che impiega la chimica F-moc (Fluorenil-metilossi-carbonil cloruro), ad esempio, è particolarmente efficiente proprio per la conformazione che i peptidi assumono durante la sintesi stessa e consente tra l'altro rese elevate di prodotto con un conseguente abbattimento dei costi nella prospettiva di una produzione su larga scala. Inoltre, il tecnico di settore può realizzare la sintesi dei peptidi secondo una qualsiasi tecnica convenzionale ed ottenerne un grado farmaceutico senza necessità di esercitare attività inventiva o, in alternativa, commissionarne la sintesi a compagnie che offrono tra i loro servizi la sintesi di peptidi.

BIBLIOGRAFIA

1. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220** (4599): 868-71.
2. Gallo RC, Salahuddin SZ, et al. (1984). "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS." *Science* **224** (4648): 500-3.
3. Merson MH. (1993). "Slowing the spread of HIV: agenda for the 1990s." *Science* **260** (5112): 1266-8.
4. Berkelman RL and Buehler JW. (1990). "Public health surveillance of non-infectious chronic diseases: the potential to detect rapid changes in disease burden." *Int J Epidemiol* **19** (3): 628-35.
5. McIntyre J. (2005). "Preventing mother-to-child transmission of HIV: successes and challenges." *Bjog* **112** (9): 1196-203.
6. Lusher JM, Operskalski EA, et al (1991). "Risk of human immunodeficiency virus type 1 infection among sexual and nonsexual household contacts of persons with congenital clotting disorders". *Pediatrics* **88**: 242–249.
7. Cohen MS, Shugars DC, Fiscus SA. (2000). "Limits on oral transmission of HIV-1". *The Lancet* **356** (9226): 272.
8. Scully C and Porter S (2000). "HIV topic update: Oro-genital transmission of HIV". *Oral Dis* **6**: 92–98.
9. Mercader M, Nickoloff BJ, et al. (2001). "Induction of human immunodeficiency virus 1 replication by human herpesvirus 8". *Arch Pathol Lab Med* **125**: 785-789.
10. Tomas MS, Claudia OM, et al. (2004). "Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria. I: determination of hydrogen peroxide". *Methods Mol Biol* **268**: 337–346.
11. Ashton M, Sopwith W, et al. (2003). "An outbreak no longer: factors contributing to the return of syphilis in Great Manchester". *Sex Transm Infect* **79**: 291-293.
12. Giard M, Queyron PC, et al. (2003). "The recent increase of syphilis cases in Lyon university hospital is mainly observed in HIV-infected

- patients: descriptive data from a laboratory based surveillance system". *J Acquir Immune Defic Syndr* **34**: 441-443.
13. Campo J, Perea MA, et al. (2006). "Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update". *Oral Dis* **12**: 219-228.
 14. Moutsopoulos MN, Greenwell-Wild T, Wahl SM. (2006). "Differential mucosal susceptibility in HIV-1 transmission and infection". *Adv Dent Res* **19** : 52-56.
 15. Meng G, Wei X, et al. (2002). "Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells". *Nat Med* **8**: 150-156.
 16. Milush JM, Kosub D, et al. (2004). "Rapid dissemination of SIV following oral inoculation". *AIDS* **18**: 2371-2380.
 17. Brenchley JM, Schacker TW, et al. (2004). "CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract". *J Exp Med* **200**: 749-759.
 18. Greenwell-Wild T, Ma G, et al. (2006). "Innate host defense in oral mucosal resistance to HIV-1" (abstract). *Adv Dent Res* **19**: 172.
 19. Wallace M, Bartz SR, et al. (1996). "Gamma delta T lymphocyte responses to HIV". *Clin Exp Immunol* **103**: 177-184.
 20. Lehner T (2003). "Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection". *Vaccine* **21**(Suppl 2): S68-S76.
 21. Thielens NM, Tacnet-Delorme P, Arlaud GJ (2002). "Interaction of C1q and mannan-binding lectin with viruses". *Immunobiology* **205**: 563- 574.
 22. Stoiber H, Pruenster M, et al. (2005). "Complement-opsonized HIV: the free rider on its way to infection". *Mol Immunol* **42**: 153-160.
 23. Wang W, Owen SM, et al. (2004). "Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1". *J Immunol* **173**: 515-520.
 24. Tanabe H, Ouellette AJ, et al. (2004). "Differential effects on human immunodeficiency virus type 1 replication by alpha-defensins with comparable bactericidal activities". *J Virol* **78**: 11622-11631.
 25. Crombie R (2000). "Mechanism of thrombospondin-1 anti-HIV-1 activity". *AIDS Patient Care STDS* **14**: 211-214.
 26. Swart PJ, Kuipers EM, et al. (1998). "Lactoferrin. Antiviral activity of lactoferrin". *Adv Exp Med Biol* **443**: 205-213.

27. Nagashunmugam T, Friedman HM, et al. (1997). "Human submandibular saliva specifically inhibits HIV type 1". *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**: 371-376.
28. Kaul R, Trabattoni D, et al. (1999). "HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers". *AIDS* **13**: 23-29.
29. Devito C, Hinkula J, et al. (2002). "Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects". *J Acquir Immune Defic Syndr* **30**: 413-420.
30. Scarlatti G (2004). "Mother-to-child transmission of HIV-1: advances and controversies of the twentieth centuries". *(AQ) AIDS Rev* **6**:67-78.
31. Baron S, Poast J, et al. (2000). "Oral transmission of human immunodeficiency virus by infected seminal fluid and milk: a novel mechanism". *J Infect Dis* **181**: 498–504.
32. Fultz PN. (1986). "Components of saliva inactivate human immunodeficiency virus". *The Lancet* **2** (8517): 1215.
33. Shugars DC (1999). "Endogenous mucosal antiviral factors of the oral cavity". *J Infect Dis* **179** (Suppl. 3): S431–S435.
34. Vincent Nn Malvoisin E, et al. (2004). "Detection of IgA inhibiting the interaction between gp120 and soluble CD4 receptor in serum and saliva of HIV-1-infected patients". *AIDS* **18** (1): 37-43.
35. Matsuda S, Oka S, et al. (1993). "Characteristics of IgA antibodies against HIV-1 in sera and saliva from HIV-seropositive individuals in different clinical stages". *Scand J Immunol* **38**:428–34.
36. Sweet SP, Challacombe SJ, Naglik JR (1995). "Whole and parotid saliva IgA and IgA-subclass responses to *Candida albicans* in HIV infection". *Adv Exp Med Biol* **371B**:1031–4.
37. McNeely TB, Dealy M, et al. (1995). "Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro". *J Clin Invest* **96**:456–64.
38. Nagashunmugam T, Malamud D, et al. (1998). "Human submandibular saliva inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection by displacing envelope glycoprotein gp120 from the virus". *J Infect Dis* **178**:1635–41.
39. Cole AM and Lehrer RI. (2003). "Minidefensins: antimicrobial peptides with activity against HIV-1". *Curr Pharm Des* **9**: 1463–1473.

40. Quinones-Mateu ME, Lederman MM, et al. (2003). "Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 Replication". *AIDS* **17**: F39–F48.
41. Robinovitch MR, Ashley RL, et al. (2001). "Parotid salivary basic proline-rich proteins inhibit HIV-1 infectivity". *Oral Dis* **7**: 86-93.
42. Beeley JA. (2001). "Basic proline-rich proteins: multifunctional defence molecules?". *Oral Dis* **7**:69-70.
43. Azen EA, Latreille P, Niece RL. (1993). "PRB1 gene variants coding for length and null polymorphisms among human salivary Ps, PmF, PmS and Pe proline-rich proteins (PRPs)". *Am J Hum Genet* **53**: 264–278.
44. Beeley JA, Sweeney D. et al. (1991). "Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis of human parotid salivary proteins". *Electrophoresis* **12**: 1032–1041.
45. Williamson MP. (1994). "The structure and function of proline-rich regions in proteins". *Biochem J* **297**: 249–260.
46. Messana I, Cabras T, et al. (2008). "Trafficking and post-secretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides: a proteomics approach". *Mol Cell Proteomics* **7**:911-926.
47. Newman F, Beeley JA, et al. (1993). "Salivary protein interactions with oral bacteria: an electrophoretic study". *Electrophoresis* **14**: 1322–1327.
48. Newman F, Beeley JA, MacFarlane TW. (1996). "Adherence of oral micro-organisms to human parotid salivary proteins". *Electrophoresis* **17**: 266–270.
49. O'Sullivan JM, Cannon RD, et al. (1997). "Identification of salivary basic proline-rich proteins as receptor for *Candida albicans* adhesion". *Microbiology* **143**: 341-348.
50. Beeley JA and Newmann F. (1995). "Basic; proline rich protein Ps1: a polymorphic protein with multiple functions". *Eur J Oral Sci* **103**: S11.
51. Gu M, Haraszthy GG, et al (1995). "Identification of salivary proteins inhibiting herpes-simplex virus 1 replication". *Oral Microbiol Immunol* **10**: 54–59.
52. McNeely TB, Dealy M, et al. (1995). "Secretory leukocyte protease inhibitor- a human saliva protein exhibiting antihuman immunodeficiency-virus-1 activity *in-vitro*". *J Clin Invest* **96**: 456–464.
53. Shugars DC and Wahl SM (1998). "The role of the oral environment in HIV-1 transmission". *J Am Dent Assoc* **129**: 851–858.

54. Jeffreys R (2010). "Towards a cure: HIV reservoirs and strategies to control them". *J Int AIDS society: Workshop report* **13** (suppl.3).
55. Iglesias-Ussel MD and Romerio F (2011). "HIV reservoirs: the new frontier". *AIDS Rev* **13**:13-29.
56. Saksena NK, Wang B, et al. (2010). "HIV reservoirs *in vivo* and new strategies for possible eradication of HIV from the reservoirs sites". *HIV/AIDS- Research and palliative care* pp.103-122.
57. Margolis DM (2010). "Mechanisms of HIV latency: an emerging picture of complexity". *Curr HIV/AIDS Rep* **7**:37-43.
58. Chomont N, El-Far M, et al. (2009). "Hiv reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation". *Nat Med* **15**: 893-900.
59. Stangler T, Tran T, et al. (2007). "Competitive displacement of full-length HIV-1 Nef from the Hck SH3 domain by a high-affinity artificial peptide". *Biol Chem* **388**: 611-5.
60. Tribble RP, Ermet-Sedlak L and Smithgall TE (2006). "HIV-1 Nef selectively activates SRC family kinases Hck, Lyn, and c-Src through direct SH3 domain interaction". *J Biol Chem* **281** (37):27029-38.
61. Briggs SD, Scholtz B, et al (2001). "HIV-1 Nef promotes survival of myeloid cells by a Stat3-dependent pathway". *J Biol Chem* **276** (27):25605-11.
62. Castagnola M, Cabras T, et al (2011). "Biotechnological implications of the salivary proteome". *Trends Biotechnol.* **29** (8):409-18.