

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Facoltà di Medicina e Chirurgia



DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE

*XXI CICLO 2005 - 2008*

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

Tesi di Dottorato

**La proteina Nef di HIV attiva le cellule FcεRI<sup>+</sup>**

RELATORE

**Ch.mo**

**Prof. Amato de Paulis**

CANDIDATO

**Dott.ssa**

**Francesca W. Rossi**

## **INDICE**

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>15</b>
<i>Reagenti</i>	<b>15</b>
<i>Purificazione dei basofili dal sangue periferico</i>	<b>16</b>
<i>Purificazione dei mastociti polmonari (HLMC)</i>	<b>17</b>
<i>Analisi citofluorimetrica</i>	<b>17</b>
<i>Chemiotassi</i>	<b>18</b>
<b>ELISA</b>	<b>19</b>
<i>Analisi statistica</i>	<b>19</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>20</b>
<i>Effetti di Nef sulla chemiotassi dei basofili umani</i>	<b>20</b>
<i>Espressione di CXCR4 sui basofili umani</i>	<b>20</b>
<i>Effetto dell'anti CXCR4 sulla chemiotassi dei basofili indotta da Nef</i>	<b>21</b>
<i>Desensibilizzazione eterologa tra proteina Nef e SDF1-<math>\alpha</math></i>	<b>22</b>

<i>Effetti di Nef sul rilascio di chemochine dai basofili umani</i>	22
<i>Espressione di CXCR4 sui mastociti polmonari umani</i>	23
<i>Effetti della proteina Nef sulla chemiotassi dei mastociti polmonari umani</i>	23
<b>DISCUSSIONE</b>	25
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	29
<b>FIGURE</b>	37

## ***INTRODUZIONE***

L'infezione da HIV-1 è responsabile della immunodeficienza umana acquisita (AIDS) che rappresenta, tuttora, uno dei principali problemi della sanità pubblica. Nel 2001 è stato stimato che nel mondo vi siano circa 40 milioni di persone affette da AIDS. Sebbene il numero di nuovi casi in Europa non sia, allo stato, in decremento, l'associazione di farmaci anti-virali ha significativamente ridotto i decessi per AIDS e migliorato la qualità della vita nei paesi a più elevato reddito. Nonostante questi dati incoraggianti, non è stato sinora possibile realizzare un efficace vaccino per questa malattia virale (1). Due sono i virus dell'immunodeficienza umana che possono causare infezione nell'uomo: HIV-1 e HIV-2. Di questi l'HIV-1 è assai più contagioso. Essi causano l'AIDS mediante la distruzione dei linfociti CD4<sup>+</sup>, provocando una progressiva compromissione delle difese immunitarie, soprattutto della componente cellulo-mediata, con pressoché totale inefficienza della risposta al virus (2).

Il miglior risultato ottenuto nel ridurre l'epidemia da HIV-1 è stato lo sviluppo di farmaci anti-retrovirali in grado di inibire alcune funzioni cruciali del virus; tuttavia la capacità tipica dell'HIV-1 di mutare ed adattarsi, richiede trattamenti multipli il cui utilizzo è in gran parte limitato dagli effetti collaterali e dai costi eccessivi dei farmaci. Pertanto, l'identificazione di nuovi presidi

terapeutici, utilizzando target molecolari o nuove funzioni del virus, è una condizione indispensabile per poter combattere l'epidemia con maggiore efficacia (3).

Le terapie attualmente disponibili inibiscono la retrotrascrittasi virale e le proteasi. Poiché la virulenza dell'HIV-1 dipende largamente da fattori di difesa contro l'ospite, che perdono la capacità di impedire l'ingresso del virus all'interno della cellula, consentendone la replicazione virale, l'interesse primario delle nuove strategie terapeutiche è focalizzato principalmente sulle interazioni fra il virus e le cellule bersaglio (1).

Il virus dell'immunodeficienza umana è costituito da un *envelope* lipoproteico esterno e da un *core* cilindrico interno che contiene il genoma virale (RNA a doppio stampo) ed alcune proteine. HIV-1 codifica tre proteine strutturali (matrice, capside e nucleocapside), due proteine dell'*envelope* (gp120 e gp41), tre enzimi (proteasi, trascrittasi inversa e integrasi) e sei proteine accessorie (Tat, Rev, Nef, Vpr, Vpu e Vif) (4).

I geni che codificano per le proteine strutturali, comuni alla maggior parte dei retrovirus, che contribuiscono alla architettura basale del virione e provvedono alle funzioni enzimatiche chiave per il ciclo virale, hanno un ruolo oramai ben definito. Viceversa, il ruolo delle proteine regolatorie è tutt'ora oggetto di studio. Studi recenti ipotizzano che l'estrema patogenicità del virus sia correlata proprio alle funzioni di queste proteine "accessorie".

L'involucro lipoproteico di HIV-1 è formato da una serie di proiezioni con simmetria icosaedrica. Ogni proiezione è formata da un trimero di glicoproteine identiche che rappresentano il prodotto del gene *env* che codifica per una proteina glicosilata, gp160, che viene inserita nella membrana. La scissione proteolitica di gp160 produce due glicoproteine: gp120, che costituisce la porzione esterna, e gp41 che è collocata nello spessore della membrana. gp120 e gp41 si associano tra loro in un'interazione non covalente (5).

L'ingresso del virus HIV-1 nelle cellule del sistema immunitario implica la complessa interazione tra la gp120 e la glicoproteina di membrana CD4, che è il recettore primario del virus (6). Il legame CD4-gp120 induce alcune modificazioni conformazionali nella struttura di quest'ultima, con conseguente esposizione e/o formazione di specifici siti di legame per diversi recettori per chemochine (CCR5, CXCR4 e CCR3) che funzionano da co-recettori obbligati per la penetrazione del virus. L'interazione con i co-recettori induce l'esposizione di un dominio di fusione idrofobico della subunità transmembrana della gp41 che è responsabile della fusione della membrana del virus con la cellula bersaglio (7). Dopo la fusione, il virus libera il contenuto del proprio capsido direttamente all'interno del citoplasma (Fig. 1).

Molteplici evidenze cliniche e sperimentali hanno consentito di identificare alcune caratteristiche comuni tra due condizioni morbose apparentemente non correlate: la sindrome da immunodeficienza acquisita e le malattie allergiche.

Infatti, numerosi studi clinici e biologici hanno documentato in maniera convincente che sia nei pazienti atopici (8), sia in quelli con infezioni da HIV-1 vi è un'alterata regolazione della sintesi di IgE (9-11).

Diversi studi epidemiologici hanno documentato che in pazienti con infezione da HIV-1 vi è una maggiore prevalenza e severità di reazioni allergiche rispetto a gruppi di soggetti di controllo. Nei pazienti con infezione da HIV-1 sono molto frequenti lesioni cutanee di tipo eritemato-papuloso, che rappresentano una delle manifestazioni precoci della malattia (12). Inoltre, la prevalenza delle reazioni avverse a farmaci è aumentata in pazienti con infezioni da HIV-1 (13).

E' interessante sottolineare che è frequente il riscontro di elevati livelli di IgE sieriche nei pazienti adulti e pediatrici affetti da HIV-1 (14,15,16). I meccanismi immunologici alla base dell'incremento dei livelli di IgE nella patologia da HIV-1 non sono stati ancora completamente chiariti. Gli elevati livelli di IgE nei bambini e negli adulti con infezioni da HIV-1 si associano ad una rapida progressione della malattia e ad una prognosi peggiore (17,18). Pertanto, si ritiene attualmente che nei pazienti con infezione da HIV-1 gli aumentati livelli di IgE possano rappresentare un marcatore di prognosi grave.

I basofili e i mastociti sono le uniche cellule che, nell'uomo, esprimono i recettori ad alta affinità per le IgE (FcεRI) (19,20). Esse svolgono un importante ruolo patogenetico nelle malattie allergiche dell'apparato respiratorio e cutaneo

ed in molteplici condizioni patologiche dell'apparato cardiaco, gastrointestinale e muscolo-scheletrico. I basofili ed i mastociti sintetizzano molteplici mediatori della flogosi e svolgono un ruolo centrale nella difesa dell'ospite dalle infezioni e nel rimodellamento dei tessuti (19,20).

L'interazione dell'antigene con la porzione Fab delle IgE presenti su basofili e mastociti ed il conseguente legame a ponte dei recettori FcεRI attiva una serie di eventi biochimici che inducono la sintesi e il rilascio di numerosi mediatori chimici (19-21). I mastociti, ma non i basofili, esprimono il recettore c-kit, che è il ligando naturale dello *stem cell factor* (SCF) (22), una importante citochina che regola lo sviluppo, la chemiotassi e la degranolazione di tali cellule.

I mediatori chimici sintetizzati dai basofili e dai mastociti umani sono responsabili delle manifestazioni cliniche delle malattie allergiche. Queste cellule contengono granuli citoplasmatici, il cui contenuto può essere liberato, attraverso un meccanismo di esocitosi, in seguito ad attivazione da parte di stimoli immunologici IgE- e non IgE-mediati. Le cellule FcεRI<sup>+</sup> sintetizzano l'istamina che è in grado di contrarre la muscolatura liscia bronchiale, aumentare la permeabilità vascolare, modulare il flusso coronarico e la funzione linfocitaria. I basofili ed i mastociti umani, dopo stimolazione IgE-mediata, sintetizzano quantità significative di leucotriene C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) e di prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) (19,20,23-25).

Numerosi gruppi di ricerca hanno dimostrato che le cellule  $Fc\epsilon RI^+$  umane sintetizzano molteplici citochine e chemochine. In particolare, i basofili sintetizzano IL-4, IL-13 e MIP-1 $\alpha$ , IL-8 mentre i mastociti sintetizzano uno spettro più ampio di citochine (IL-4, IL-5, IL-8, IL-16, TNF- $\alpha$ , etc.) e MIP-1 $\alpha$  (19,20). Queste ultime osservazioni indicano che in molteplici malattie immunomediate le cellule  $Fc\epsilon RI^+$  umane svolgono anche una significativa funzione immunoregolatrice (26).

E' noto che in corso d'infezione da HIV-1 si osserva una disregolazione dei livelli di IgE ed una polarizzazione  $T_H2$ , fenomeni dovuti entrambi a diversi prodotti di origine virale. Le cellule  $Fc\epsilon RI^+$  producono sia IL-4 sia IL-13, due classiche citochine  $T_H2$ , in quantità fino a 20 volte maggiori rispetto ai linfociti (27), in seguito a stimolazione immunologica.

Diversi studi condotti da Marone e collaboratori hanno dimostrato che alcune proteine dell'HIV-1 (gp120, gp41 e Tat) sono in grado di alterare la funzionalità delle cellule  $Fc\epsilon RI^+$ . In particolare la gp120 induce un'attivazione dei basofili e dei mastociti umani attraverso l'interazione con le IgE  $V_H3^+$  presenti sulla membrana; ciò determina la sintesi di IL-4 e di IL-13 (28). gp120 è in grado di funzionare da superantigene immunoglobulinico inducendo la sintesi di quantità significative di due citochine che svolgono un ruolo significativo nella polarizzazione  $T_H2$ . Quest'ultimo fenomeno è associato con

la progressione della malattia da HIV-1 (29). La proteina Tat di HIV-1 è deputata alla transattivazione del genoma virale, ma, interagendo con il recettore per le  $\beta$ -chemochine (eotassina e RANTES) CCR3, è anche un potente fattore chemiotattico per basofili e mastociti. Inoltre la proteina Tat up-regola i livelli dell'mRNA di CCR3 e l'espressione di CCR3 sui basofili umani (30). Quest'ultima osservazione è di una certa rilevanza, in quanto è stato dimostrato da diversi gruppi che CCR3 può funzionare da co-recettore per l'infezione delle cellule del sistema immunitario da parte di diversi ceppi di HIV-1 (31-33).

Un'altra proteina dell'envelope virale, gp41, attraverso l'interazione specifica con i recettori per i peptidi formilati (FPRs), promuove la migrazione delle cellule  $Fc\epsilon RI^+$  nei siti di infezione. Recenti evidenze dimostrano che le cellule  $Fc\epsilon RI^+$  umane esprimono anche la glicoproteina CD4 (de Paulis *et al.*, osservazione non pubblicata). L'insieme di queste considerazioni ha consentito di prospettare che le cellule  $Fc\epsilon RI^+$  possano essere infettate da alcuni ceppi di virus HIV-1(28,30,34). E' stato, inoltre, ipotizzato che i basofili ed i mastociti possano rappresentare un nuovo meccanismo di diffusione (basofili circolanti) e di *reservoir* (mastociti tissutali) di HIV-1. Tale ipotesi ha trovato recentemente conferma da parte di due gruppi di ricercatori che hanno dimostrato che precursori di cellule  $Fc\epsilon RI^+$  umane, isolate dal sangue periferico, possono essere infettate *in vitro* da virus HIV-1 M tropici (35,36). Queste osservazioni evidenziano le numerose interazioni tra i prodotti di HIV-1 e le cellule  $Fc\epsilon RI^+$  e

suggeriscono che queste cellule esplicano un importante ruolo nell'infezione da HIV-1.

Una delle proteine dell'HIV coinvolte nella regolazione dell'infezione è chiamata Nef. Essa è una piccola proteina, espressa largamente nelle fasi iniziali dell'infezione, che si è dimostrata essenziale nella replicazione e nella progressione della infezione da HIV (37,38). In considerazione del suo ruolo patogenetico, questo fattore ha attratto l'interesse di diversi gruppi di ricerca; in particolare si è iniziato a considerare come un potenziale target per la prevenzione ovvero per il rallentamento della infezione. La rallentata progressione della malattia in pazienti infettati da forme virali delete del gene Nef (38), ha consentito di ipotizzare che esso sia un fattore patogeno fondamentale. Se esso tuttavia svolga una funzione incrementando i livelli di replicazione o se svolga una azione patogena diretta è ancora oggetto di studio. In entrambi i casi sembrerebbe logico ipotizzare la possibilità di bloccarne le funzioni per ridurre la severità della patologia. Il problema più complesso nello studio di Nef è di comprenderne le molteplici funzioni ed il ruolo di ognuna nell'ambito della patogenesi virale. Ciascuna funzione è geneticamente separata dalle altre e pertanto rappresenta un possibile target distinto per la inibizione della infettività virale (3). D'altro canto, è facilmente deducibile, che, se ogni funzione è distinta dall'altra, non vi sarà la possibilità di bloccare totalmente l'attività di Nef con un unico farmaco.

La struttura della proteina è stata chiarita grazie a studi di cristallografia e spettrometria (39) (Fig. 2). Nef è una proteina multifunzionale con un peso molecolare che varia dai 27 ai 35 kDa, priva di attività enzimatica, espressa esclusivamente da HIV-1/2 e SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*). Il gene *nef* è situato al 3'-terminale del genoma virale e subisce una modificazione post-translazionale che ne determina la fosforilazione e l'attacco irreversibile di un acido miristico all'*N*-terminale. Inizialmente si riteneva che la proteina Nef fosse di scarsa rilevanza e che fosse coinvolta nella inibizione della trascrizione. Da questa proprietà prende origine il nome del gene: "*negative factor*". Sono state identificate molteplici funzioni di Nef: essa funziona come proteina adattatrice, modificando, in corso di infezione, le proteine dell'ospite in proteine aberranti in grado di amplificare la replicazione virale. Quattro sono le principali funzioni *in vitro* di Nef: 1) riduce l'espressione di CD4 sui linfociti T attraverso l'internalizzazione e la sua successiva degradazione mediante il *pathway* lisosomiale, 2) regola negativamente le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I); 3) modula il signaling del T cell receptor (TCR) mediante il legame con la catena  $\zeta$  del CD3; 4) attiva diversi *pathways* intracellulari (serin/treonine e tirosine chinasi) (3) (Fig. 3).

Più recentemente è stato inoltre dimostrato che l'espressione di Nef nei monocito/macrofagi umani induce un incremento della sintesi e del rilascio di numerosi fattori proinfiammatori (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ), il

che che suggerisce un possibile ruolo di tale proteina nella regolazione della chemiotassi linfocitaria (40-42). I linfociti T *resting*, che sono normalmente refrattari, diventano attivi e suscettibili all'infezione quando esposti a Nef. Questi risultati permettono di identificare un meccanismo che consente al virus di reclutare i linfociti T nei siti di replicazione virale e forniscono le basi del meccanismo attraverso il quale Nef promuove la replicazione del virus nella cellula ospite.

E' stato anche dimostrato che Nef inibisce la chemiotassi dei linfociti T CD4<sup>+</sup> indotta da SDF-1 $\alpha$  (43), un ligando specifico del recettore CXCR4 che è anche un co-recettore per alcuni ceppi di HIV-1.

La proteina Nef esiste anche in forma solubile, secreta dalle cellule infettate, e può essere individuata nei liquidi biologici (44). E' da chiarire se gli effetti paracrini di Nef sulle cellule possano essere ricondotti all'interazione diretta con il recettore CXCR4 (45) o ad un'azione indiretta sul traffico intracellulare delle proteine di membrana (46).

In questo studio abbiamo valutato le possibili interazioni tra virus HIV-1 e cellule Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> verificando se in questo complesso quadro di relazioni tra i prodotti virali e le cellule Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> anche la proteina Nef possa svolgere un ruolo patogenetico. Abbiamo dimostrato che Nef induce la chemiotassi dei basofili e dei mastociti umani. La migrazione di cellule Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> indotta da Nef è abolita in maniera specifica dalla preincubazione dei basofili con anticorpi monoclonali

(mAb) diretti contro CXCR4. I risultati del nostro studio dimostrano che Nef è in grado di influenzare la migrazione direzionale delle cellule FcεRI<sup>+</sup> mediante l'interazione con CXCR4 di indurre la secrezione di chemochine da queste cellule.

## ***MATERIALI E METODI***

### *Reagenti*

Sono stati utilizzati i seguenti reagenti: HClO<sub>4</sub> 60% (Baker Chemical Co., Deventer, The Netherlands); albumina sierica umana (HSA), α-chimotripsina, PIPES, ialuronidasi, chimopapaina, elastasi di tipo I, 1,4-dithi-L-threitol, e PMSF (Sigma, St. Louis, MO); HBSS, FCS, (Life Technologies, Grand Island, NY); DNasi I e Pronasi (Calbiochem, La Jolla, CA); RPMI 1640 con 25 mM HEPES buffer e Eagle's MEM (Flow Laboratories, Irvine, Scotland); destrano 70 e Percoll (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Anti-CXCR4 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA ); le IgG policlonali di coniglio da animali non immunizzati sono state ricevute da Sigma. L'Ab Fcε è stato donato dai dottori Teruko e Kimishige Ishizaka (*La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA*). IgG monoclonale di topo anti FcεRI è stata donata da Dr John Hakimi (Hoffmann-LaRoche, Nutley, NJ). La proteina Nef di HIV-1 usata in questi esperimenti è stata gentilmente fornita dal Dott. Maurizio Federico (Istituto Superiore di Sanità, Roma).

Il tampone utilizzato in questi esperimenti è composto da PIPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 110 mM, KCl 5 mM. Esso è designato dalla lettera "P". Il tampone PCG contiene, oltre a P, CaCl<sub>2</sub> 5 mM e 1 g/L di D-glucosio. Il tampone PACGM contiene, oltre a P, albumina sierica umana al 3%, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, 1 g/L

di destrosio e 0,25 g/L di  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,4; il PGMD contiene, oltre a P, 0,25 g/L di  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/L di DNase, e 1 g/L di gelatina, pH 7,4. Il PBS contiene 8 g/L di NaCl, 1,15 g/L di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 200 mg/L di KCl, e 200 mg/L di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4.

#### *Purificazione dei basofili dal sangue periferico*

I basofili sono stati purificati dal sangue periferico di donatori sani, negativi per gli anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 (di età compresa tra i 20 ed i 39 anni) afferenti al Servizio di Immunoematologia dell'Università di Napoli Federico II. I leucociti sono stati risospesi in PBS contenente 0,5 g/L di albumina sierica umana (HSA) e 3,42 g/L di sodio citrato, e quindi purificati usando un elutriatore controcorrente (Beckman, Fullerton, CA). Le frazioni contenenti più di  $20 \times 10^6$  basofili e con una buona purezza ( $>15\%$ ) sono state ulteriormente purificate usando un gradiente discontinuo Percoll. I basofili sono stati infine isolati, con un'omogeneità  $>98\%$ , eliminando linfociti B, monociti, cellule NK, cellule dendritiche, eritrociti, piastrine, neutrofili, eosinofili e linfociti T mediante un cocktail di anticorpi anti-HLA-DR e apteni coniugati CD3, CD7, CD14, CD15, CD16, CD36, CD45RA e MACS MicroBeads coniugate con anticorpi anti-aptenti. Le cellule magneticamente marcate sono state eliminate attraverso ritenzione in una colonna su supporto magnetico della MidiMACS (Miltenyi Biotec. Bergisch Gladbach, Germany). Con tale metodica

sono stati ottenuti un numero di basofili variabile tra  $3$  e  $10 \times 10^6$  con una purezza in genere  $>99\%$ , come attestato dalla colorazione dei basofili con Alcian blue e dal conteggio nella camera di conta per eosinofili di Spiers-Levy (47).

#### *Purificazione dei mastociti polmonari (HLMC)*

Il tessuto polmonare è stato ottenuto da pazienti sottoposti a resezione polmonare. Dal parenchima macroscopicamente sano sono stati eliminati pleura, bronchi e vasi sanguigni ed il tessuto polmonare è stato quindi sottoposto a dispersione meccanica fino ad ottenere una singola sospensione cellulare. Con tale metodica si ottiene un numero di mastociti variabile tra  $3 \times 10^6$  e  $18 \times 10^6$  e una purezza compresa tra l'1 e l'8%. I mastociti polmonari sono stati purificati usando un gradiente discontinuo di Percoll (48). Infine sono stati isolati attraverso una tecnica di selezione positiva mediante colonne di separazione MACS (Miltenyi Biotec). L'insieme di queste metodiche ha consentito di ottenere un numero adeguato di mastociti purificati ( $>98\%$ ) e vitali ( $>95\%$ ), come attestato dalla colorazione dei mastociti con Alcian blue e dal conteggio nella camera di conta per eosinofili di Spiers-Levy.

#### *Analisi citofluorimetrica*

L'analisi citofluorimetrica delle molecole presenti sulla superficie cellulare è stata condotta come descritto di seguito. Dopo la saturazione dei siti

di legame non specifici con IgG di coniglio, le cellule sono state incubate (20 minuti a 4 °C) con anticorpi specifici o con controlli isotipici. Per la marcatura indiretta, a questa fase, è seguita una seconda incubazione per 20 minuti a 4°C con un anticorpo anti-isotipo marcato con un fluorocromo. Infine, le cellule sono state lavate ed analizzate con un citofluorimetro FACSCalibur utilizzando il software Cell Quest (Becton & Dickinson, San Fernando, CA). In tutte le analisi citofluorimetriche eseguite è stato acquisito un totale di  $10^4$  eventi per ogni campione.

### *Chemiotassi*

La chemiotassi dei basofili è stata effettuata utilizzando la tecnica della camera di Boyden (48,49). In sintesi, 25  $\mu$ l di tampone (PACGM) o di concentrazioni variabili degli stimoli da testare, sono stati posti in triplicato nel compartimento inferiore di una camera per micro-chemiotassi costituita da 48 pozzetti (Neuroprobe, Cabin John, MD). Il compartimento inferiore è stato ricoperto da una membrana in policarbonato con pori di 5  $\mu$ m (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA). Successivamente 50  $\mu$ l ( $5 \times 10^4$  cellule/pozzetto) della sospensione in PAGCM sono stati aggiunti in ogni pozzetto del compartimento superiore. La camera per la chemiotassi è stata posta per 1 ora a 37°C, in un incubatore umidificato con CO<sub>2</sub> al 5% (Automatic CO<sub>2</sub> Incubator, Model 160 IR, ICN Flow). Al termine dell'incubazione dei basofili la membrana di

policarbonato è stata rimossa, lavata con PAGCM nella parte superiore, fissata e colorata con May-Grunwald/Giemsa. La chemiotassi dei basofili è stata valutata mediante la conta al microscopio del numero di cellule che sono rimaste adese alla membrana con pori da 5  $\mu\text{m}$ . Per ogni esperimento sono stati contati 10 campi per ciascuno dei pozzetti in triplicato ad un ingrandimento di 40x. L'analisi di controllo è stata eseguita per discriminare la migrazione spontanea (chemiochinesi) dalla chemiotassi indotta dagli stimoli.

### *ELISA*

Il rilascio dell'IL-8, MIP-1 $\alpha$  nei sovranatanti di basofili umani è stato determinato in duplicato utilizzando un kit commerciale per ELISA (R&D System, Minneapolis, MN).

### *Analisi statistica*

Il risultati corrispondono alla media  $\pm$  SEM. La significatività statistica è stata valutata mediante t test (50). Le differenze sono state considerate significative per  $p < 0.05$ .

## ***RISULTATI***

### *Effetti di Nef sulla chemiotassi dei basofili umani*

In una prima serie di esperimenti abbiamo valutato gli effetti di concentrazioni crescenti di due preparazioni di Nef ricombinante (ELI e NL4-3) sulla chemiotassi di basofili purificati (>99%) da sangue periferico di donatori sani negativi per anticorpi anti-HIV-1 e HIV-2. La Figura 4A mostra i risultati di sei esperimenti in cui entrambe le preparazioni di Nef (1-300 ng/ml) inducono la chemiotassi in maniera dose dipendente dei basofili.

In una serie parallela di esperimenti abbiamo paragonato l'attività chemiotattica di Nef con quella di FMLP e di SDF-1 $\alpha$  che sono potenti stimoli chemiotattici per i basofili attraverso l'attivazione dei recettori FPR e CXCR4 (51). La Figura 4B mostra che SDF-1 $\alpha$  (10 e 100 ng/ml) e FMLP (100 e 500 ng/ml) inducono la chemiotassi dei basofili umani; negli stessi esperimenti anche Nef (10 e 100 ng/ml) induceva la migrazione dei basofili.

### *Espressione di CXCR4 su basofili umani*

Abbiamo investigato l'espressione costitutiva di CXCR4 sui basofili umani a livello proteico mediante citometria a flusso. Basofili purificati (>99%) ottenuti da donatori sani negativi per anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 sono stati incubati con un anticorpo monoclonale (mAb) anti-CXCR4 marcati con il

fluorocromo PerCP e con mAb anti-IgE-FITC o con IgG di controllo. I risultati presentati in Figura 5 indicano che la maggioranza (~80%) dei basofili esprime sulla superficie gli epitopi riconosciuti dall'anticorpo monoclonale diretto contro il dominio extracellulare del recettore per le chemochine CXCR4.

*Effetto dell'anti CXCR4 sulla chemiotassi dei basofili indotta da Nef*

Al fine di verificare che il recettore CXCR4 espresso sulla superficie dei basofili fosse effettivamente responsabile dell'effetto chemiotattico indotto dalla proteina Nef, i basofili purificati da sangue periferico di donatori sani sono stati preincubati con anticorpi diretti contro CXCR4 e successivamente indotti a migrare in risposta a concentrazioni ottimali di Nef (100 ng/ml). La Figura 6 mostra i risultati di tre esperimenti in cui la preincubazione dei basofili con un anticorpo anti-CXCR4 blocca completamente l'effetto chemiotattico indotto da Nef. Analogamente, la preincubazione dei basofili con un anticorpo anti-CXCR4 sopprime completamente l'effetto chemiotattico del ligando SDF-1 $\alpha$  (100 ng/ml) su queste cellule. Viceversa, l'effetto chemiotattico del tripeptide formilato FMLP, che attiva uno specifico recettore transmembrana indipendente dal recettore CXCR4, non è influenzato dalla preincubazione con anticorpo anti-CXCR4. Tali risultati sono compatibili con l'ipotesi che il peptide di HIV-1 Nef è in grado di indurre la chemiotassi dei basofili attraverso l'interazione con il recettore CXCR4.

### *Desensibilizzazione eterologa tra proteina Nef e SDF1- $\alpha$*

L'interazione tra il recettore CXCR4 e la proteina Nef sono state ulteriormente investigate mediante esperimenti di cross-desensibilizzazione tra SDF1- $\alpha$  e Nef. I basofili purificati (99%) sono stati incubati con PIPES contenente EDTA (4 mM) o con SDF-1 $\alpha$  (100 ng/ml) o con Nef (100 ng/ml) in PIPES buffer contenente EDTA (4 mM) per 30 min a 37°C. Alla fine dell'incubazione, i basofili sono stati lavati due volte, risospesi in PACGM, stimolati con SDF-1 $\alpha$  (100 ng/ml) e Nef (100 ng/ml). La Figura 7 mostra i risultati di tre esperimenti nei quali la risposta a SDF-1 $\alpha$  è stata significativamente desensibilizzata dalla preincubazione con uno stimolo omologo o eterologo. Analogamente la preincubazione con Nef inibisce sensibilmente l'attività chemiotattica sia di Nef che di SDF-1 $\alpha$ .

### *Effetti di Nef sul rilascio di chemochine dai basofili umani*

È stato dimostrato che Nef media indirettamente la chemiotassi dei linfociti attraverso la produzione di MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$  da parte dei macrofagi infettati (41). Inoltre, Nef aumenta i livelli di mRNA per MIP-1 $\alpha$ /MIP-1 $\beta$  e di diverse altre citochine nei monociti umani (40). L'attivazione immunologica dei basofili umani induce il rilascio selettivo di IL-8 e di MIP-1 $\alpha$  (19,20). Abbiamo, quindi, valutato la cinetica di rilascio delle chemochine

(IL-8 and MIP-1 $\alpha$ ) indotta da Nef nei basofili umani. I risultati di tre esperimenti dimostrano che Nef non induce rilascio di chemochine dopo un'ora di incubazione dei basofili. Viceversa, si osserva un significativo rilascio di chemochine dopo 4 e 18 ore di incubazione dei basofili con Nef (Figure 8A e 8B).

#### *Espressione di CXCR4 sui mastociti polmonari umani (HLMC)*

Mastociti purificati (>99%) ottenuti dal tessuto polmonare di pazienti sottoposti ad interventi di resezione polmonare sono stati incubati con un mAb anti-CXCR4-PerCP e con un mAb anti-IgE-FITC o con IgG purificate di controllo. I risultati presentati nella Figura 9 indicano che la maggioranza (~65%) dei mastociti esprime CXCR4.

#### *Effetti della proteina Nef sulla chemiotassi dei mastociti polmonari umani (HLMC)*

La maggioranza dei mastociti umani (~65%) esprime il recettore CXCR4. Tale recettore è funzionalmente attivo ed è coinvolto nella risposta chemiotattica indotta da SDF-1 $\alpha$  (52). La Figura 10 mostra i risultati di quattro esperimenti nei quali abbiamo valutato l'effetto di Nef (5-100 ng/ml) sulla chemiotassi delle HLMC. E' possibile osservare che i mastociti polmonari sono in grado di

migrare, in risposta a Nef, in maniera dose dipendente, con una potenza solo di poco inferiore al controllo positivo rappresentato dall'SDF-1 $\alpha$ .

## ***DISCUSSIONE***

Molti virus adottano la strategia di utilizzare omologhi delle citochine e chemochine umane per proteggere le cellule infette dalle risposte immunitarie e promuovere la sopravvivenza del virus nell'ospite (53,54). L'esistenza di questi omologhi delle proteine cellulari è una prova indiretta del loro ruolo rilevante nell'organizzazione delle difese immunitarie dell'ospite all'invasione dei patogeni. Molti grandi virus a DNA e.g. herpes virus umano, compresi CMV e HHV-8, come anche il poxvirus molluscum contagiosum, codificano per diversi omologhi delle  $\beta$ -chemochine (virochine) attive sui recettori CCR3 o CCR8.

Questo studio dimostra che la proteina Nef di HIV-1 è una virochina funzionalmente attiva sulle cellule  $Fc\epsilon RI^+$  umane. Essa, infatti, è un potente fattore chemiotattico per i basofili ed i mastociti umani e il suo effetto chemiotattico è mediato dall'interazione con il recettore CXCR4 presente sulla maggior parte di queste cellule. I risultati ottenuti rappresentano la prima dimostrazione che Nef interagisce in maniera specifica con il recettore CXCR4. Questa conclusione è basata sul dato che un mAb anti-CXCR4 blocca completamente l'effetto chemiotattico della proteina Nef nei basofili e nei mastociti umani. Inoltre, anche la cross-desensibilizzazione della chemiotassi tra SDF-1 $\alpha$  e la proteina Nef è compatibile con l'ipotesi che Nef interagisca specificamente con il recettore CXCR4 espresso sulle cellule  $Fc\epsilon RI^+$  umane.

Infine, abbiamo dimostrato che Nef induce la produzione di chemochine (MIP-1 $\alpha$  and IL-8) nei basofili umani.

L'importanza di queste osservazioni è duplice. Esse suggeriscono che durante le fasi iniziali della infezione di HIV-1 in cui si osserva una elevata viremia (2) e di proteina Nef nei fluidi biologici (44), i basofili ed i mastociti potrebbero essere richiamati chemiotatticamente attraverso l'azione di Nef, contribuendo così al reclutamento di queste cellule nei siti di infezione. Inoltre, l'attività chemiotattica di Nef verso le cellule umane Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> potrebbe contribuire all'incremento della densità locale di mastociti e di basofili disponibili per l'interazione con HIV-1 attraverso la gp120 virale legata o solubile. Infatti, è stato già dimostrato che gp120 interagisce con IgE V<sub>H</sub>3<sup>+</sup> presente sulle cellule Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> umane. L'interazione superantigenica tra gp120 e IgE porta ad una rapida sintesi e rilascio di IL-4 e IL-13 dalle cellule Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> umane (28). Questa interazione potrebbe rappresentare la fonte iniziale di citochine in grado di favorire la polarizzazione dal fenotipo T<sub>H</sub>0 a T<sub>H</sub>2 (20).

I risultati ottenuti in questo studio rappresentano un'ulteriore prova dell'importante ruolo rivestito dalle citochine e dai loro omologhi virali nel processo di invasione dei patogeni e nella organizzazione delle difese immunitarie. Questi nostri dati, infatti, suggeriscono che la proteina Nef di HIV-1 possa funzionare come una virochina codificata da HIV-1 che è funzionalmente attiva sulle cellule Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> umane attraverso l'interazione con il

recettore CXCR4. Questa nuova osservazione potrebbe avere diverse implicazioni per una miglior comprensione della patogenesi dell'infezione da HIV-1.

I nostri risultati dimostrano che Nef interagisce specificamente con CXCR4 espresso sia sui basofili che sui mastociti umani. Concentrazioni significative di Nef sono presenti nei liquidi biologici di pazienti affetti da HIV-1 ( $\approx 10$  ng/ml) (44). Nei tessuti dove si verifica la replicazione virale (i linfonodi), i livelli locali di Nef potrebbero essere superiori a tali valori. La densità dei mastociti è accresciuta nei linfonodi dei pazienti affetti da HIV-1 (55). Le fasi precoci dell'infezione da HIV-1 sono associate ad alti livelli di viremia (44) e ciò potrebbe essere associato ad elevati livelli di Nef, la cui l'attività chemochino-simile sulle cellule Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> potrebbe, quindi, avere una forte rilevanza clinica nei pazienti affetti da HIV-1.

Studi precedenti hanno dimostrato che Nef regola negativamente l'espressione di CXCR4 sulla superficie dei linfociti T infetti con HIV-1 con efficienza comparabile a quella di SDF-1 $\alpha$  che è ligando naturale di CXCR4 (56). Lo stesso gruppo di ricerca ha dimostrato che la proteina Nef è un modulatore ad ampio spettro di otto differenti membri della famiglia di recettori di superficie CC e CXC. Poiché CXCR4, espresso costitutivamente dai basofili e dai mastociti (51,52), è uno dei co-recettori obbligati per la penetrazione di HIV-1 nelle cellule (57,58), l'eventuale modulazione dell'espressione e delle

funzioni di CXCR4 da parte di Nef potrebbe avere un forte impatto sulla infettività di HIV-1. Infatti è verosimile ipotizzare che Nef extracellulare possa contribuire a rendere una più larga popolazione di cellule FcεRI<sup>+</sup> suscettibile a HIV-1 nel corso dell'infezione.

In conclusione, i risultati di questo studio rappresentano la prima evidenza che la proteina Nef è un omologo delle chemochine codificato da HIV-1 per le cellule FcεRI<sup>+</sup> umane. La proteina Nef interagisce con il recettore CXCR4 presente su queste cellule. Poiché HIV-1 penetra nell'organismo prevalentemente attraverso le mucose e poiché le fasi precoci dell'infezione sono associate ad alti livelli di viremia, i mastociti e i basofili possono essere esposti ad alti livelli locali di proteina Nef (Fig. 11). Ciò suggerisce che tali cellule possano contribuire, anche attraverso i meccanismi descritti in questo studio, alla disregolazione del sistema immunitario nell'infezione da HIV-1.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. TRKOLA A. 2004. HIV-host interactions: vital to the virus and key to its inhibition. *Curr. Opin. Microbiol.*,7:407-411.
2. KINTER A., ARTHOS J., CICALA C., FAUCI A.S. 2000. Chemokines, cytokines and HIV: a complex network of interactions that influence HIV pathogenesis. *Immunol. Rev.* 177:88-98.
3. FOSTER J.L., GARCIA J.V. 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology.* 5:84.
4. XU X.N., SCREATON G., 2001. HIV-1 Nef: negative effector of Fas? *Nat. Immunol.* 2:384-5.
5. FREED E.O., MARTIN A.M. 1995. The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J. Biol. Chem.* 270:23883-6.
6. KWONG P.D., WYATT R., ROBINSON J., SWEET R.W., SODROSKI J., HENDRICKSON W.A. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature.* 393:648-59.
7. LAWESS M.K., BARNEY S., GUTHRIE K.I., BUCY T.B., PETTEWAY S.R., MERUTKA G. 1996. HIV-1 membrane fusion mechanism: structural studies of the interactions between biologically-active peptides from gp41. *Biochemistry.* 35:13697-708.
8. ROMAGNANI S. 2000. The role of lymphocytes in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105:399-408.
9. SHOR-POSNER G., MIGUEZ-BURBANO M.J., LU Y., FEASTER D., FLETCHER M., SAUBERLICH H., BAUM M.K. 1995. Elevated IgE level in relationship to

- nutritional status and immune parameters in early human immunodeficiency virus-1 disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 95:886-92.
10. AGARWAL S.K., MARSHALL G.D. 1998. In vivo alteration in type-1 and type-2 cytokine balance: a possible mechanism for elevated total IgE in HIV-infected patients. *Hum. Immunol.* 59:99-105.
11. MARONE G., FLORIO G., TRIGGIANI M., PETRAROLI A., DE PAULIS A. 2000. Mechanisms of IgE elevation in HIV-1 infection. *Crit. Rev. Immunol.* 20:477-96.
12. KAPLAN M.H., SADICK N., MCNUTT N.S., MELTZER M. 1987. Dermatologic finding and manifestations of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J. Am. Acad. Dermatol.* 16:485-506.
13. COOPMAN S.A., JHONSON R.A., PLATT R., STERN R.S. 1993. Cutaneous disease and drug reaction in HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 328:1670-1674.
14. LUCEY D.R., ZAJAC R.A., MELCHER G.P., BUTZIN C.A., BOSWELL R.N. 1990. Serum IgE levels in 622 persons with human immunodeficiency virus infection: IgE elevation with marked depletion of CD4<sup>+</sup> T-cells. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 6:427-429.
15. KOUTSONIKOLIS A., NELSON R.P., FERNANDEZ-CALDAS E., BRIGINO E.N., SELEZNICK M., GOOD R.A., LOCKEY R.F. 1996. Serum total and specific IgE levels in children infected with human immunodeficiency virus. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97:692-7.
16. SECORD E.A., KLEINER G.I., AUCI D.L., SMITH-NOROWITZ T., CHICE S., FINKIELSTEIN A., NOWAKOWSKI M., FIKRIG S., DURKIN H.G. 1996. IgE against HIV proteins in clinically healthy children with HIV disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:979-84.

17. ISRAËL-BIET D., LABROUSSE F., TOURANI J.M., SORS H., ANDRIEU J.M., EVEN P. 1992. Elevation of IgE in HIV-infected subjects: a marker of poor prognosis. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 89:68-75.
18. Rancinan C, Morlat P, Chêne G, Guez S, Baquey A, Beylot J, Salamon R. 1998. IgE serum level: a prognostic marker for AIDS in HIV-infected adults? *J. Allergy Clin. Immunol.* 102:329-30.
19. MARONE G., TRIGGIANI M., GENOVESE A., DE PAULIS A. 2005. Role of human mast cells and basophils in bronchial asthma. *Adv. Immunol.* 88:97-160.
20. MARONE G., TRIGGIANI M., DE PAULIS A. 2005. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? *Trends Immunol.* 26:25-31.
21. MARONE G., LICHTENSTEIN L.M., GALLI S.J. 2000. Mast Cells and Basophils. *Academic Press, San Diego.*
22. GALLI, S.J., TSAI M., WERSHIL B. K. 1993. The c-kit receptor, stem cell factor and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am. J. Pathol.* 142:965-74.
23. MARONE G., CASOLARO V., PATELLA V., FLORIO G., TRIGGIANI M. 1997. Molecular and cellular biology of mast cells and basophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114:207-17.
24. TRIGGIANI M., CASOLARO V., GENOVESE A., SPADARO G., MARONE G. 1993. Heterogeneity of human FcεRI-bearing cells. *Ann. Allergy.* 71:133-8.
25. MARONE G., SPADARO G., DE MARINO V., ALIPERTA M., TRIGGIANI M. 1998. Immunopharmacology of human mast cells and basophils. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 28:12-22.

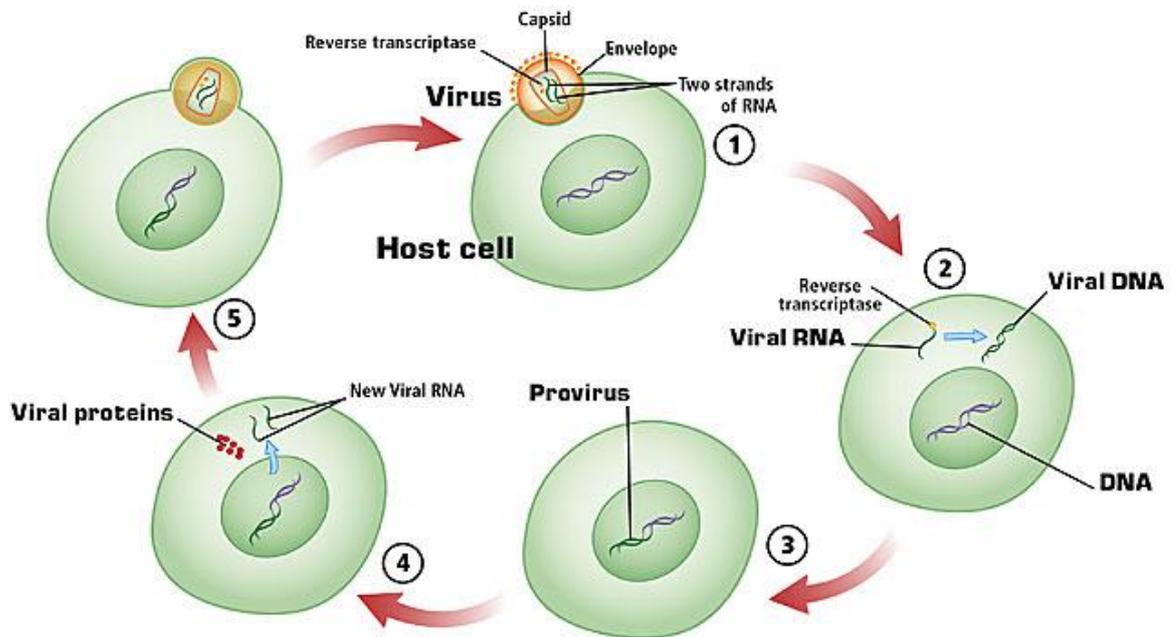
- 26.METCALFE D.D., BARAM D., MEKORI Y.A. 1997. Mast cells. *Physiol. Rev.* 77:1033-79.
- 27.PATELLA V., GIULIANO A., BOUVET J.P., MARONE. G. 1998. Endogenous superallergen protein Fv induces IL-4 secretion from human FcεRI<sup>+</sup> cells through interaction with the V<sub>H</sub>3 region of IgE. *J. Immunol.* 161:5647-55.
- 28.PATELLA V., FLORIO G., PETRAROLI A., MARONE G. 2000. HIV-1 gp120 induces IL-4 and IL-13 release from human FcεRI<sup>+</sup> cells through interaction with the V<sub>H</sub>3 region of IgE. *J. Immunol.* 164: 589-95.
- 29.BECKER Y.2004. The changes in the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that maybe reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers: a review and hypothesis. *Virus Genes.* 28:5-18.
- 30.DE PAULIS A., DE PALMA R., DI GIOIA L., CARFORA M., PREVETE N., TOSI G., ACCOLLA R.S., MARONE G. 2000. Tat protein is an HIV-1-encoded β-chemokine homolog that promotes migration and up-regulates CCR3 expression on human FcεRI<sup>+</sup> cells. *J. Immunol.* 165:7171-9.
- 31.CHOE H., FARZAN M., SUN Y., SULLIVAN N., ROLLINS B., PONATH P.D., WU L., MACKAY C.R., LAROSA G., NEWMAN W., GERARD N., GERARD C., SODROSKI J. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* 85:1135-48.
- 32.HE J., CHEN Y., FARZAN M., CHOE H., OHAGEN A., GARTNER S., BUSCIGLIO J., YANG X., HOFMANN W., NEWMAN W., MACKAY C.R., SODROSKI J., GABUZDA D. 1997. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature.* 385:645-9.

33. GHORPADE A., XIA M.Q., HYMAN B.T., PERSIDSKY Y., NUKUNA A., BOCK P., CHE M., LIMOGES J., GENDELMAN H.E., MACKAY C.R. 1998. Role of the beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 in human immunodeficiency virus type 1 infection of monocytes and microglia. *J. Virol.* 72:3351-61.
34. DE PAULIS A., FLORIO G., PREVETE N., TRIGGIANI M., FIORENTINO I., GENOVESE A., MARONE G. 2002. HIV-1 envelope gp41 peptides promote migration of human FcεRI<sup>+</sup> cells and inhibit IL-13 synthesis through interaction with formyl peptide receptors. *J. Immunol.* 169:4559-67.
35. TAUB D.D., MIKOVITS J.A., NILSSON G., SCHAFFER E.M., KEY M.L., PETROW-SADOWSKI C., RUSCETTI F.W. 2004. Alteration in mast cell function and survival following in vitro infection with human immunodeficiency viruses-1 through CXCR4. *Cell. Immunol.* 230:65-80.
36. BANNERT N., FARZAN M., FRIEND D.S., OCHI H., PRICE K.S., SODROSKI J., BOYCE J.A. 2001. Human Mast cell progenitors can be infected by macrophagetropic human immunodeficiency virus type 1 and retain virus with maturation in vitro. *J. Virol.* 75:10808-14.
37. SINCLAIR E., BARBOSA P., FEINBERG M.B. 1997. The nef gene products of both simian and human immunodeficiency viruses enhance virus infectivity and are functionally interchangeable. *J. Virol.* 71:3641-51.
38. KIRCHHOFF F., SCHINDLER M., SPECHT A., ARHEL N., MUNCH J. 2008. Role of Nef in primate lentiviral immunopathogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 65:2621-36.
39. FRANKEN P., AROLD S., PADILLA A., BODEUS M., HOH F., STRUB M.P., BOYER M., JULLIEN M., BENAROUS R., DUMAS C. 1997. HIV-1 Nef protein:

- Purification, crystallizations, and preliminary X-ray diffraction studies *Protein Sci.* 6:2681-3.
40. OLIVETTA E., PERCARIO Z., FIORUCCI G., MATTIA G., SCHIAVONI I., DENNIS C., JÄGER J., HARRIS M., ROMEO G., AFFABRIS E., FEDERICO M. 2003. HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation. *J. Immunol.* 170:1716-27.
41. SWINGLER S., MANN A., JACQUE' J., BRICHACEK B., SASSEVILLE V.G., WILLIAMS K., LACKNER A.A., JANOFF E.N., WANG R., FISHER D., STEVENSON M. 1999. HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat. Med.* 5:997-103.
42. LEHMANN M.H., WALTER S., YLISASTIGUI L., STRIEBEL F., OVOD V., GEYER M., GLUCKMAN J.C., ERFLE V. 2006. Extracellular HIV-1 Nef increases migration of monocytes. *Exp. Cell. Res.* 312:3659-68.
43. CHOE E.Y., SCHOENBERGER E.S., GROOPMAN J.E., PARK I.W. 2002. HIV Nef inhibits T cell migration. *J. Biol. Chem.* 277:46079-84.
44. FUJII Y., OTAKE K., TASHIRO M., ADACHI A. 1996. Soluble Nef antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4<sup>+</sup> T cells. *FEBS Lett.* 393:93-6.
45. JAMES C.O., HUANG M.B., KHAN M., GARCIA-BARRIO M., POWELL M.D., BOND V.C. 2004. Extracellular Nef protein targets CD4<sup>+</sup> T cells for apoptosis by interacting with CXCR4 surface receptors. *J. Virol.* 78:3099-109.
46. MADRID R., JANVIER K., HITCHIN D., DAY J., COLEMAN S., NOVIELLO C., BOUCHET J., BENMERAH A., GUATELLI J., BENICHOUS S. 2005. Nef-induced

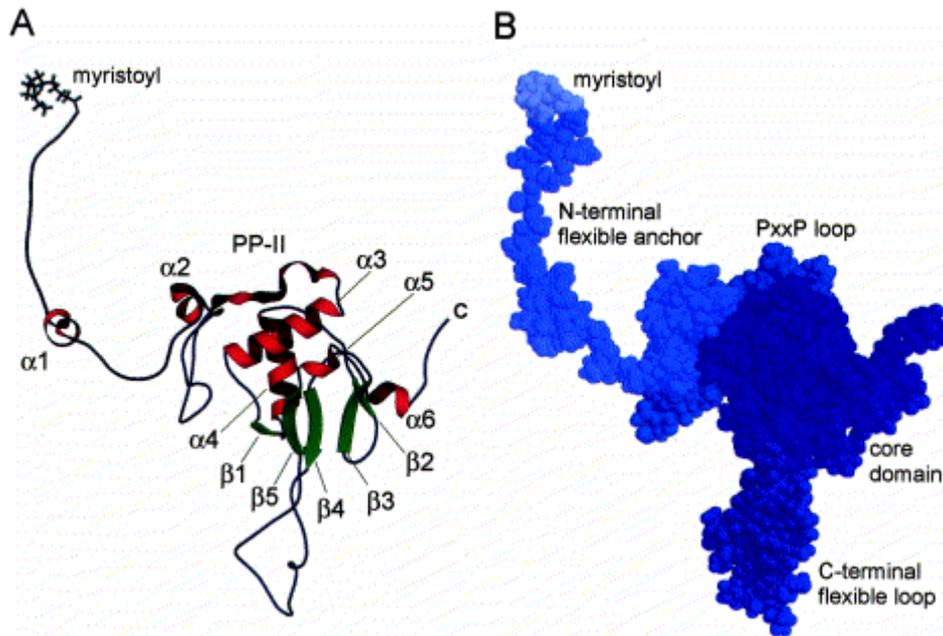
- alteration of the early/recycling endosomal compartment correlates with enhancement of HIV-1 infectivity. *J Biol Chem.* 280:5032-44.
- 47.DE PAULIS A., PREVETE N., FIORENTINO I., ROSSI F.W., STAIBANO S., MONTUORI N., RAGNO P., LONGOBARDI A., LICCARDO B., GENOVESE A., RIBATTI D., WALLS A.F., MARONE G. 2006. Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J. Immunol.* 177:7322-31.
- 48.DE PAULIS A., MINOPOLI G., ARBUSTINI E., DE CRESCENZO G., DAL PIAZ F., PUCCI P., RUSSO T., MARONE G. 1999. Stem cell factor is localized in, released from, and cleaved by human mast cells. *J. Immunol.* 163:2799-808.
- 49.ROMAGNANI P., DE PAULIS A., BELTRAME C., ANNUNZIATO F., DENTE V., MAGGI E., ROMAGNANI S., MARONE G. 1999. Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. *Am. J. Pathol.* 155:1195-204.
- 50.SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G. 1980. Statistical Methods. *Iowa State University Press, Ames, Iowa.*
- 51.JINQUAN T., JACOBI H.H., JING C., REIMERT C.M., QUAN S., DISSING S., POULSEN L.K., SKOV P.S. 2000. Chemokine stromal cell-derived factor 1alpha activates basophils by means of CXCR4. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106:313-20.
- 52.MARONE G., FLORIO G., PETRAROLI A., TRIGGIANI M., DE PAULIS A. 2001. Human mast cells and basophils in HIV-1 infection. *Trends Immunol.* 22:229-32.
- 53.KOTENKO S.V., SACCANI S., IZOTOVA L.S., MIROCHNITCHENKO O.V., PESTKA S. 2000. Human cytomegalovirus arbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:1695-700.

- 54.LALANI A.S., BARRETT J.W., MCFADDEN G. 2000. Modulating chemokines: more lessons from viruses. *Immunol. Today*. 21:100-6.
- 55.SCHACKER T. 2008. The role of secondary lymphatic tissue in immune deficiency of HIV infection. *AIDS*. 3:S13-8.
- 56.VENZKE S., MICHEL N., ALLESPACH I., FACKLER O.T., KEPPLER O.T. 2006. Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection *J. Virol*. 80:11141-52.
- 57.MOORE J.P. 1997. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science*. 276:51-2.
- 58.FENG Y., BRODER C.C., KENNEDY P.E., BERGER E.A. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. 272:872-7.



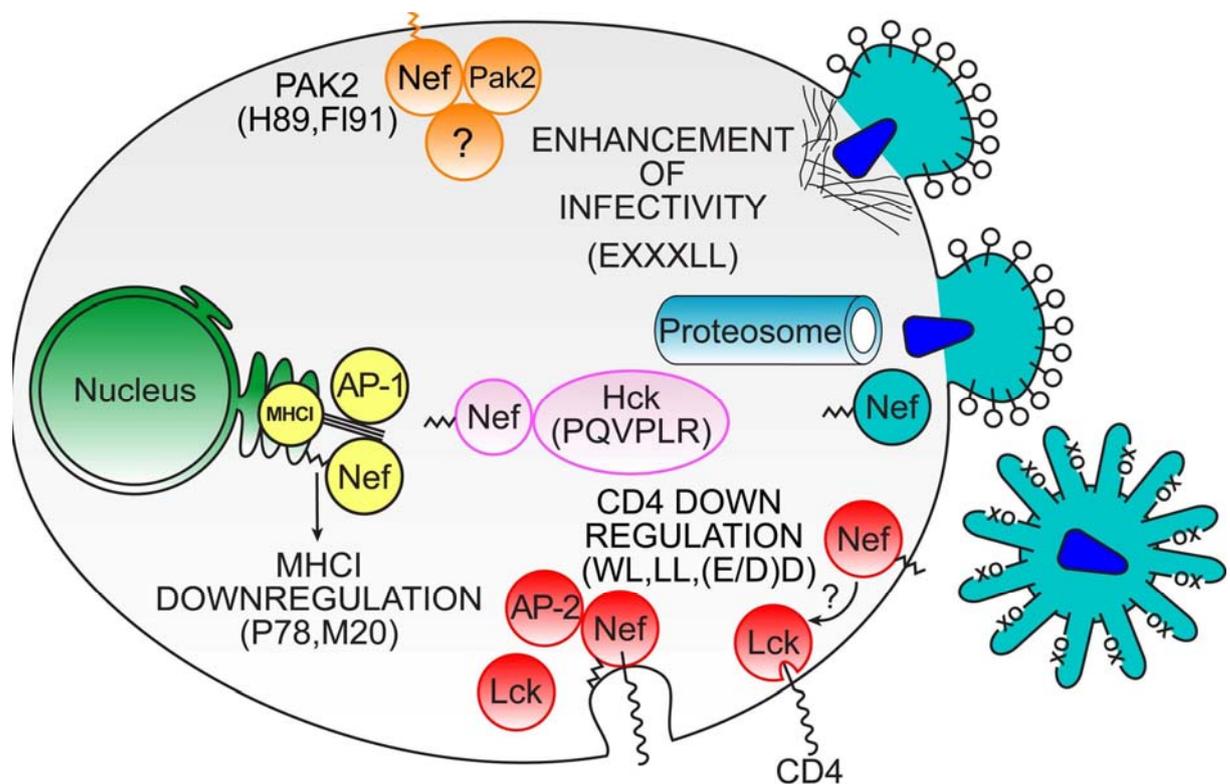
**Figura 1. Ciclo vitale dell'HIV.**

La glicoproteina virale dell'*envelope* (gp 120) interagisce con il recettore CD4 sui linfociti T. Successive modifiche conformazionali determinano la fusione della membrana virale e cellulare. La trascrittasi inversa crea una copia di cDNA dal RNA virale. Il cDNA è trasportato nel nucleo dove si integra con i cromosomi dell'ospite, generando il provirus. Inizia la trascrizione dei geni virali. Nelle fasi iniziali predomina la traduzione di proteine regolatorie, specialmente Nef; nelle fasi successive predomina quella di proteine strutturali. L'assemblaggio del nuovo virus avviene a livello della membrana plasmatica dove il genoma virale è impacchettato nel capsid che si genera dalla membrana.



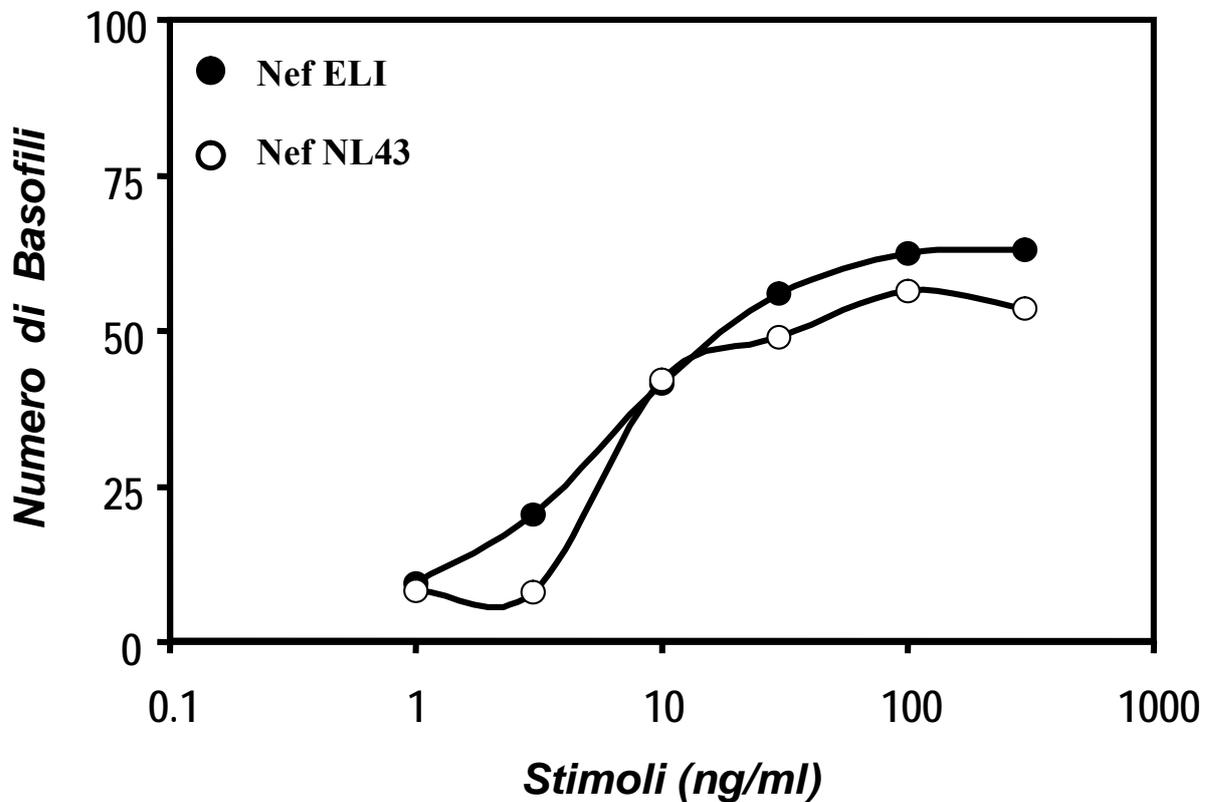
**Figura 2. Modello strutturale della forma completa miristolata della proteina Nef di HIV. (A) Presentazione a nastro. (B) Presentazione di superficie molecolare.**

Nef è una proteina con un peso molecolare che varia da 27 a 35 kDa. Essa possiede una ancora flessibile all'*N*-terminale di circa 60 residui, seguita da un *core* ben conservato al *C*-terminale di circa 130 residui. Il *core* è l'unica porzione di Nef che adotta una struttura terziaria stabile. Vi è uno specifico sito di clivaggio per le proteasi virali in corrispondenza di questi domini. Nef è modificata post-traslazionalmente da una fosforilazione e da un aggancio irreversibile di un acido miristico all'*N*-terminale.



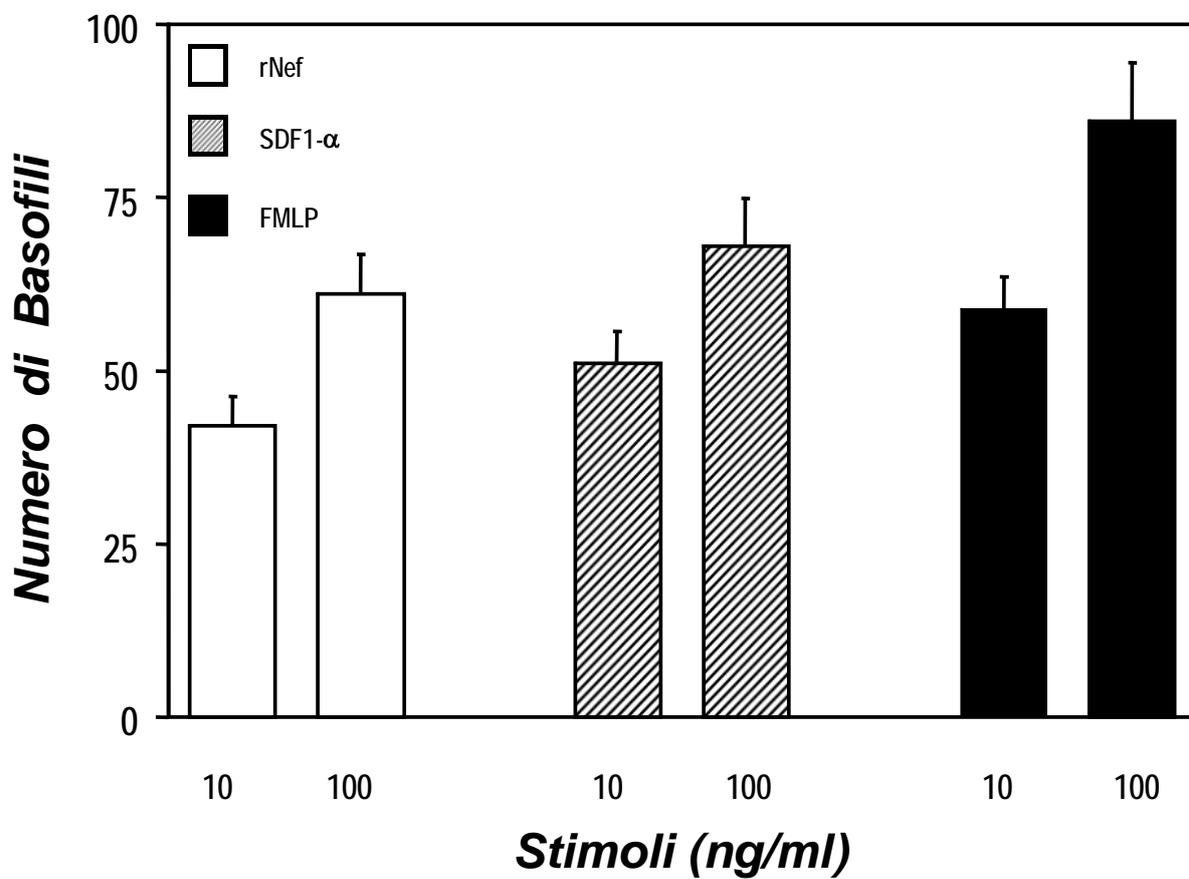
**Figura 3. Funzioni di Nef.**

(Rosso): Nef rimuove il CD4 dalla superficie cellulare (destra), si aggancia alla membrana plasmatica attraverso il gruppo miristolico e stacca Lck dalla coda citoplasmatica del CD4. A sinistra Lck è stato dissociato dalla coda citoplasmatica del CD4 e Nef si attacca alla membrane plasmatica attraverso il suo gruppo miristolico e la coda citoplasmatica del CD4. Il legame ad AP-2 facilita la formazione di vescicole rivestite di clatrina che favoriscono l'internalizzazione del CD4. (Giallo): Nef downregola l'MHCI dalla superficie delle cellule infette, lega la coda citoplasmatica dell'MHCI e AP-1. (Arancione): Nef attiva Pak2. (Rosa): Nef lega e attiva Hck. (Blu): Nef promuove la virulenza dell'HIV-1.



**Figura 4A. Effetti di concentrazioni crescenti di due preparazioni di Nef ricombinante (Nef ELI e Nef NL43) sulla chemiotassi di basofili umani.**

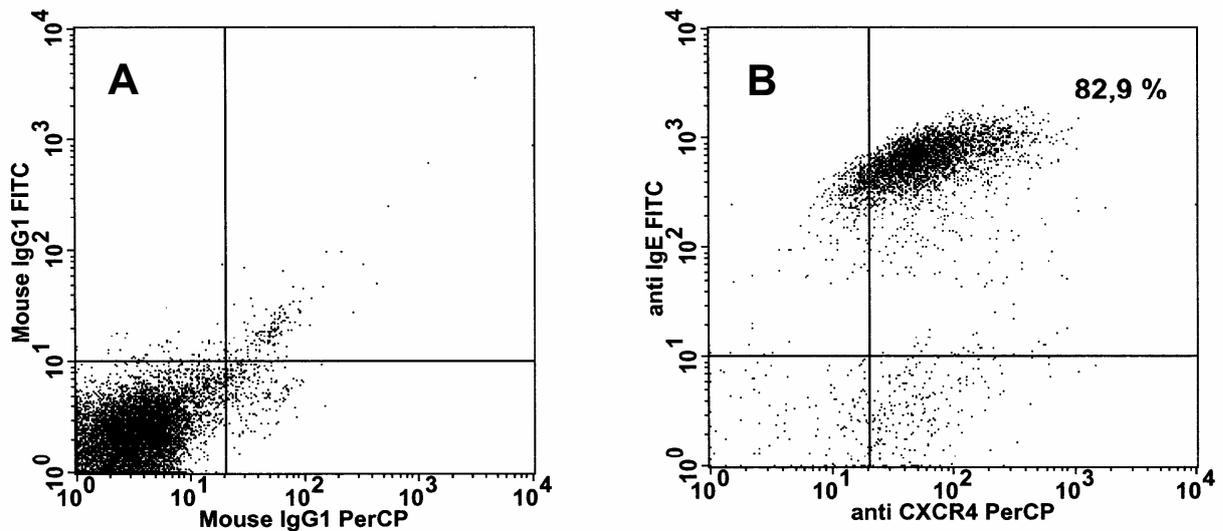
I basofili, purificati da sangue periferico di donatori sani negativi per HIV-1 e HIV-2, sono stati lasciati migrare in presenza delle concentrazioni indicate di Nef per 1 ora a 37°C in un incubatore umidificato al 5% di CO<sub>2</sub>. I valori rappresentano la media dei risultati ottenuti in sei esperimenti utilizzando diverse preparazioni di basofili.



**Figura 4B. Effetti di concentrazioni crescenti di Nef (□), SDF-1 $\alpha$  (▨), e FMLP (■) sulla chemiotassi dei basofili.**

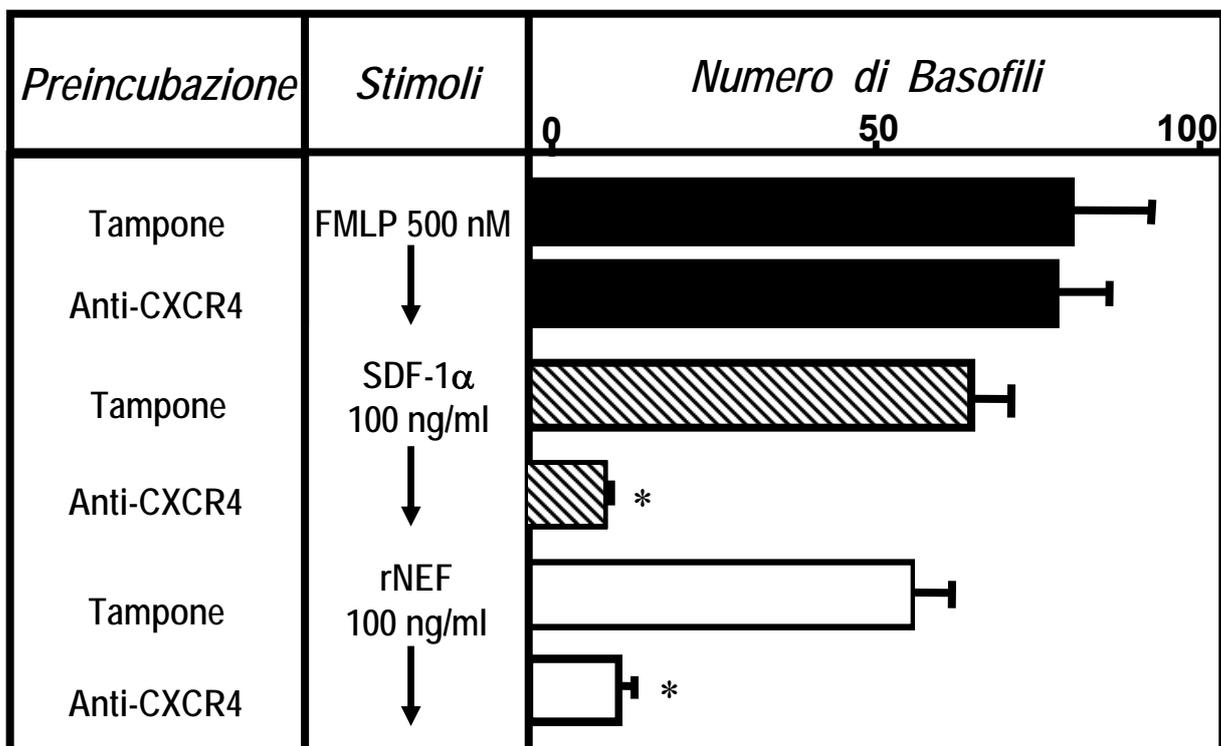
I basofili sono stati indotti a migrare alle concentrazioni indicate di stimoli per 1 ora a 37°C in un incubatore umidificato al 5% di CO<sub>2</sub>.

I valori rappresentano la media dei risultati ottenuti in quattro esperimenti utilizzando diverse preparazioni di basofili purificati da sangue periferico di donatori sani negativi per HIV-1 e HIV-2.



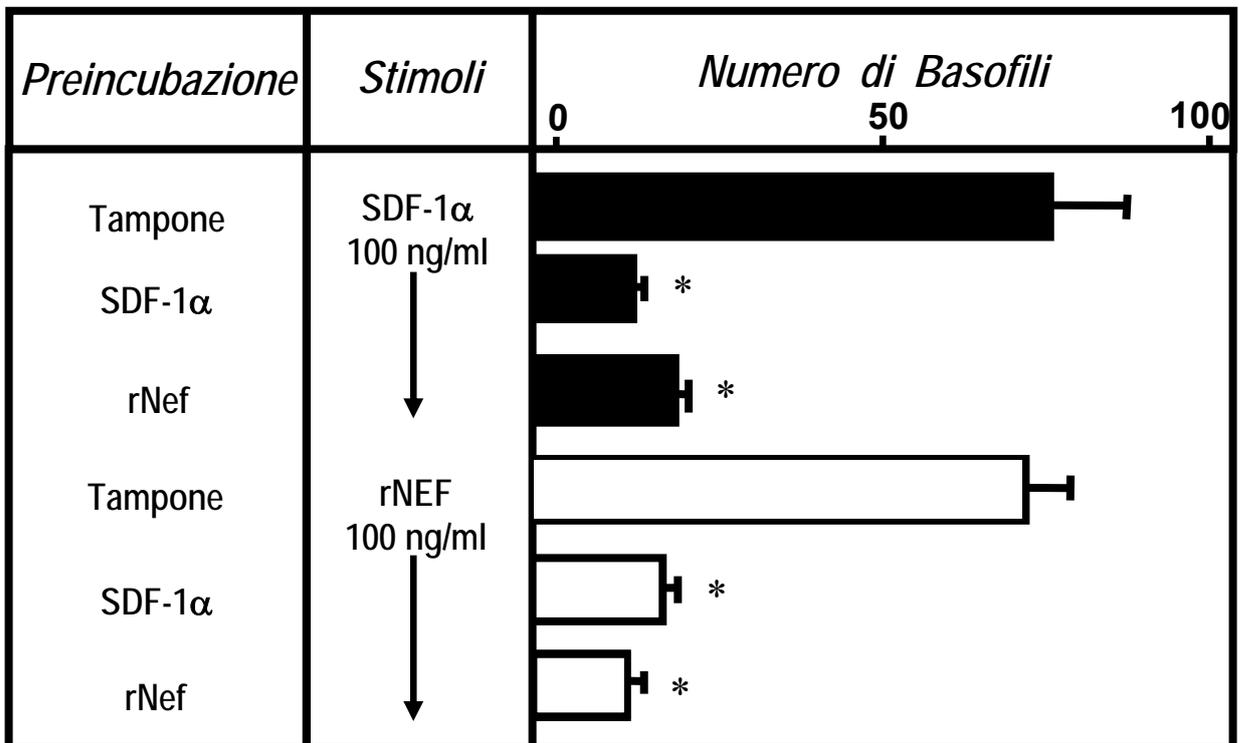
**Figura 5. Analisi citofluorimetrica dell'espressione di CXCR4 su basofili umani.**

I basofili purificati da donatori sani negativi per anticorpi anti-HIV-1 e HIV-2 sono stati incubati (25°C, 45 min.) con un anticorpo monoclonale anti-IgE-FITC ed un anticorpo monoclonale anti-CXCR4 marcato con PerCP (pannello B) o con i rispettivi controlli isotipici (pannello A).



**Figura 6. Ruolo del recettore CXCR4 nella chemiotassi indotta da rNef.**

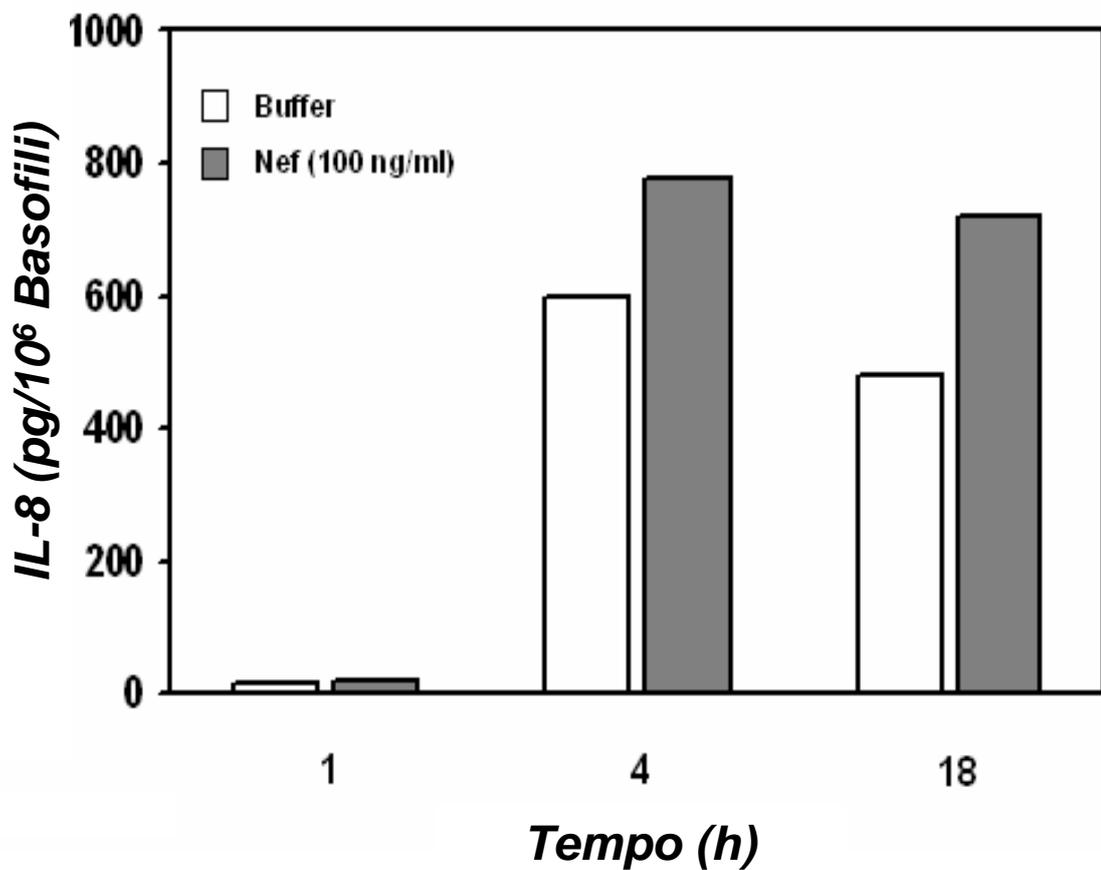
Risposta chemiotattica dei basofili umani a SDF-1α (100 ng/ml), rNef (100 ng/ml), e FMLP (500 nM), (□, ▨, ■) preincubati per 1 ora con o senza un anticorpo monoclonale anti-CXCR4 (5 μg/ml). I valori rappresentano la media dei risultati ottenuti in tre esperimenti utilizzando diverse preparazioni di basofili umani. \*, p < 0.01 confrontati con basofili preincubati con tampone.



**Figura 7. Effetti della cross-desensibilizzazione tra SDF-1α e Nef.**

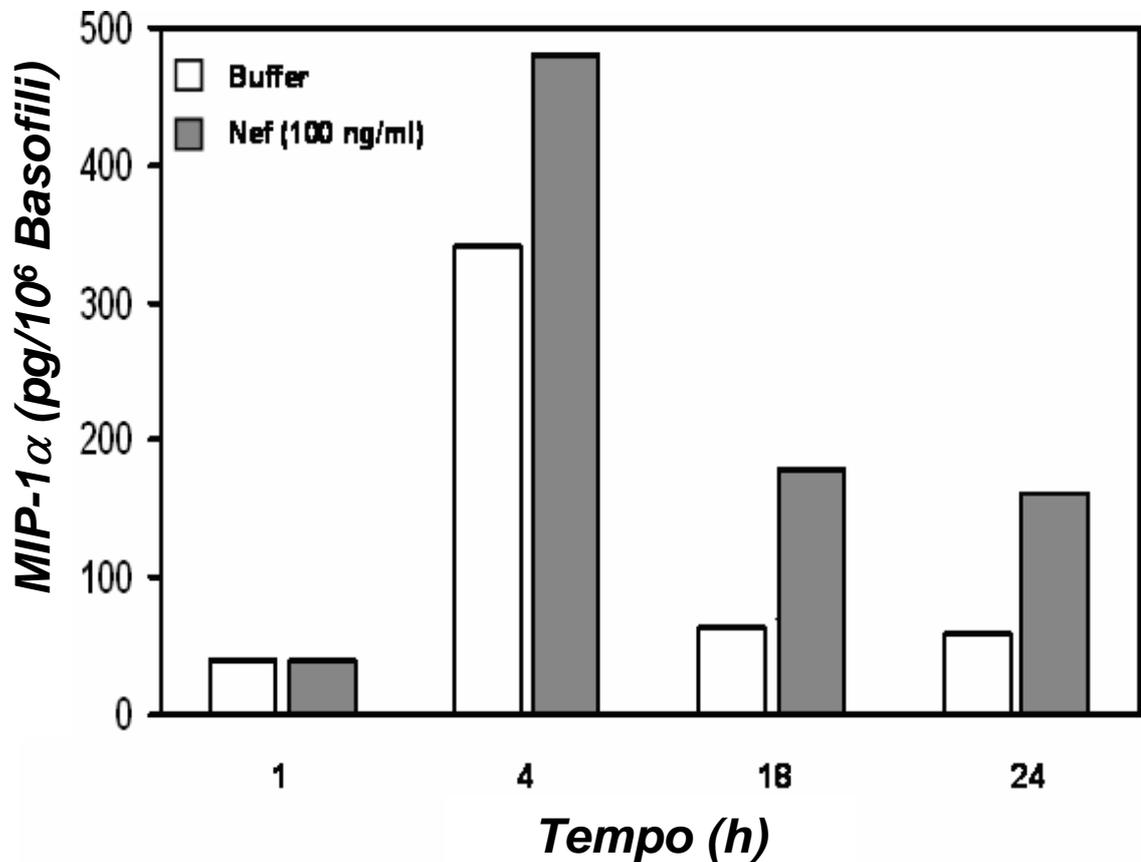
I basofili umani sono stati preincubati e successivamente ristimolati con Nef 100 ng/ml o SDF-1a 100 ng/ml. I valori rappresentano la media dei risultati ottenuti in tre esperimenti.

\*,  $p < 0.01$  confrontati con basofili in assenza di stimolo chemiotattico.



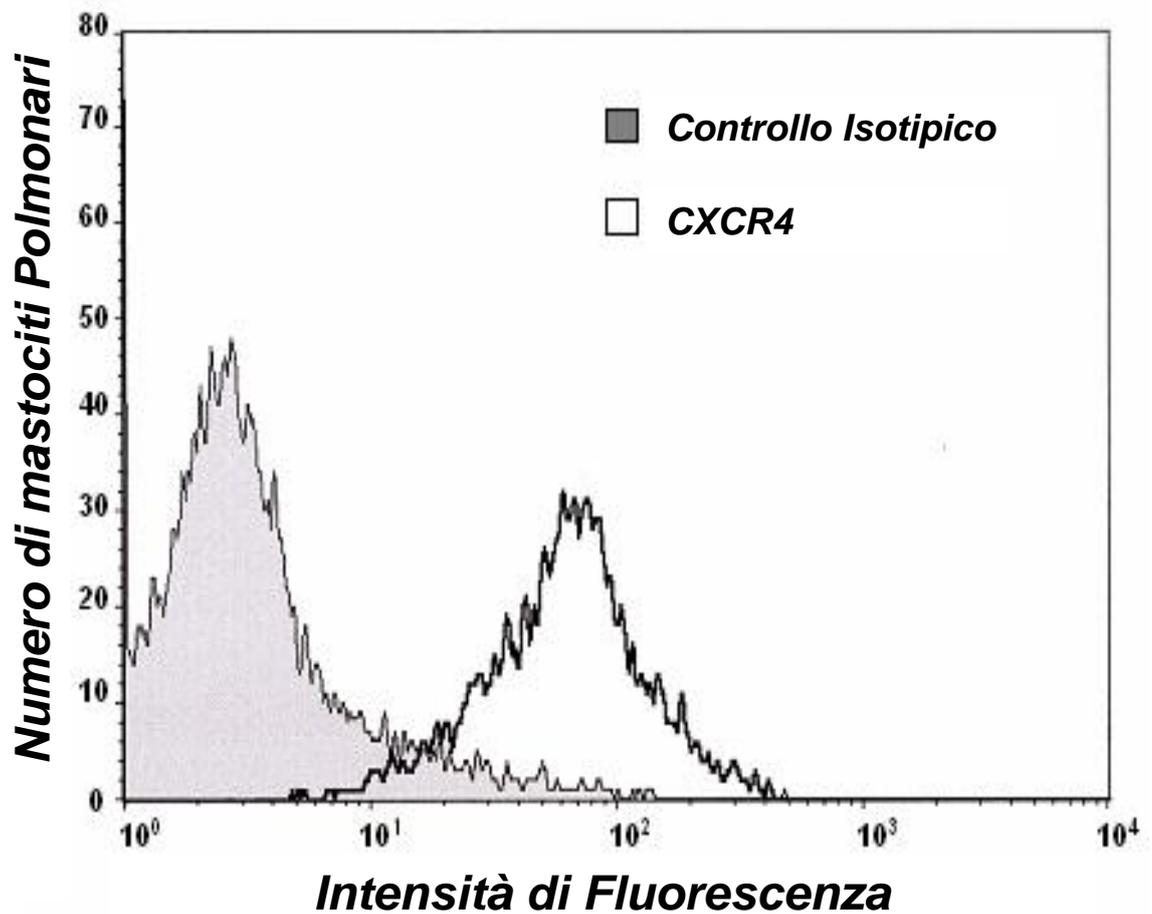
**Figura 8A. Cinetica del rilascio di IL-8 dai basofili umani.**

I basofili sono stati incubati per i tempi indicati con concentrazioni ottimali di Nef (100 ng/ml). Il rilascio delle chemochine nel soprannatante dei basofili è stato valutato mediante una specifica metodica ELISA.



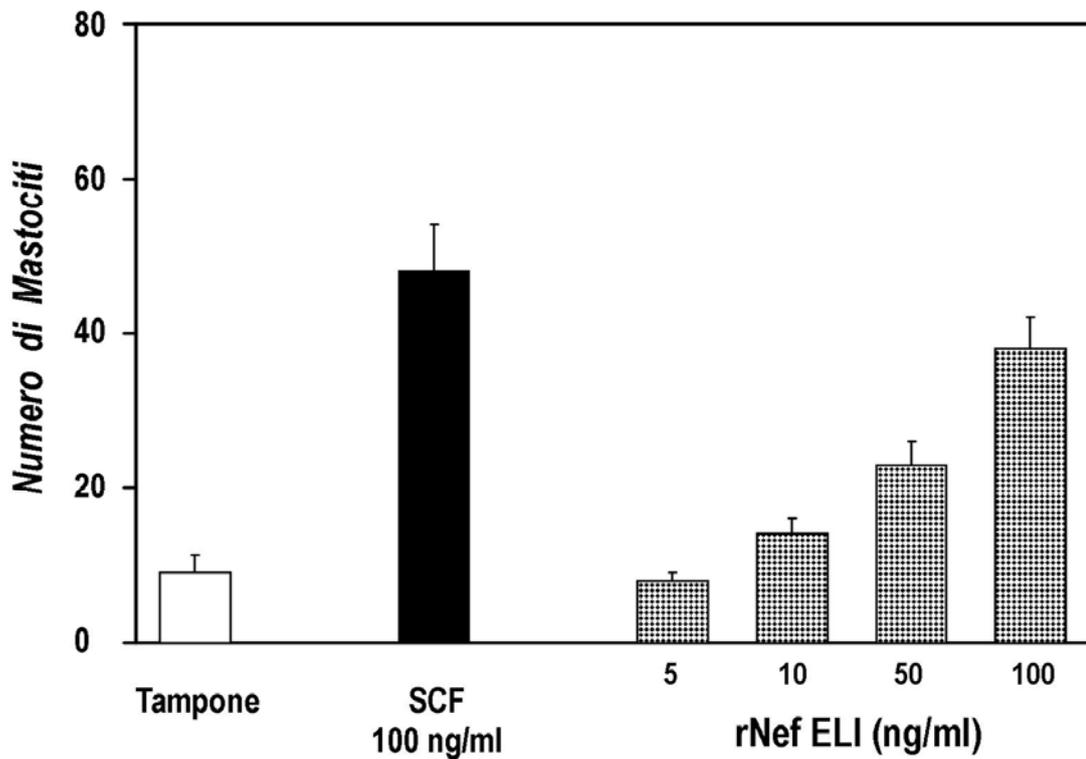
**Figura 8B. Cinetica del rilascio di MIP-1 $\alpha$  dai basofili umani.**

I basofili sono stati incubati per i tempi indicati con concentrazioni ottimali di Nef (100 ng/ml). Il rilascio delle chemochine nel soprannatante dei basofili è stato valutato mediante una specifica metodica ELISA.



**Figura 9. Analisi citofluorimetrica dell'espressione di CXCR4 su mastociti umani (HLMC).**

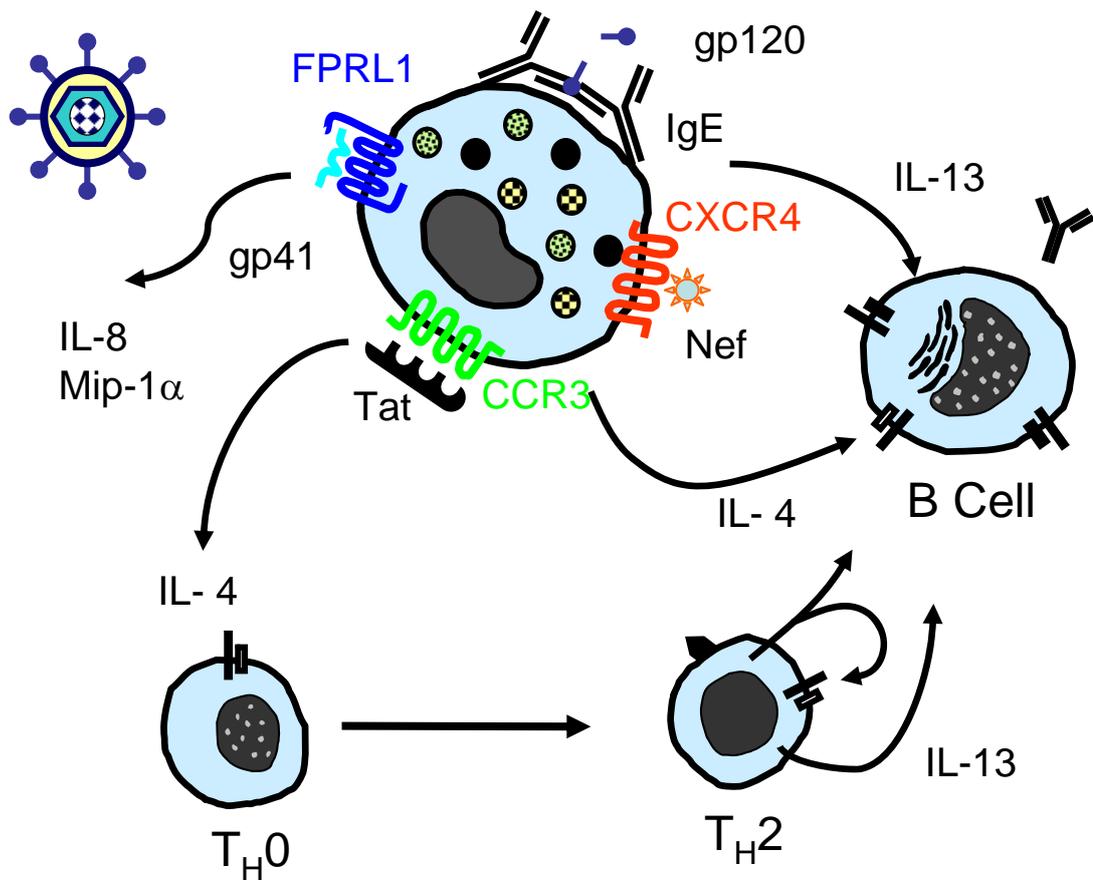
I mastociti purificati da tessuto polmonare di pazienti sottoposti a resezione polmonare, sono stati incubati (25°C, 45 min) con anticorpo monoclonale anti-CXCR4 marcato con PerCP (□) o con il rispettivo controllo isotipico (■).



**Figura 10. Effetti di rNef sulla chemiotassi dei mastociti polmonari umani (HLMC).**

I mastociti sono stati indotti a migrare nei confronti di SCF e rNEF ELI alle concentrazioni indicate, per 1 ora a 37°C in un incubatore umidificato al 5% di CO<sub>2</sub>.

I valori rappresentano la media dei risultati ottenuti in quattro esperimenti utilizzando diverse preparazioni di mastociti polmonari.



**Figura 11. Possibile meccanismo di interazione tra HIV-1 e cellule FcεRI<sup>+</sup> umane.**

HIV-1 penetra nelle cellule FcεRI<sup>+</sup> attraverso l'interazione con gp120 e gp41. gp 120 interagisce con il recettore primario CD4. Il legame gp120-CD4 induce alterazioni conformazionali di gp120 con l'esposizione di alcuni siti di legame per diversi recettori per chemochine (CCR5, CXCR4, CCR3). Il legame con i corecettori induce ulteriori modifiche conformazionali di gp120 con l'esposizione di un dominio idrofobico di fusione di gp41 che determina la fusione della membrana cellulare al virus.

In questo complesso sistema Nef interagisce con il recettore CXCR4 presente sulle cellule FcεRI<sup>+</sup> e ne promuove la chemiotassi; le cellule reclutate nei siti di replicazione virale rilasciano citochine (IL-8 e MIP-1α) svolgendo un ruolo patogenetico rilevante nella progressione della malattia.