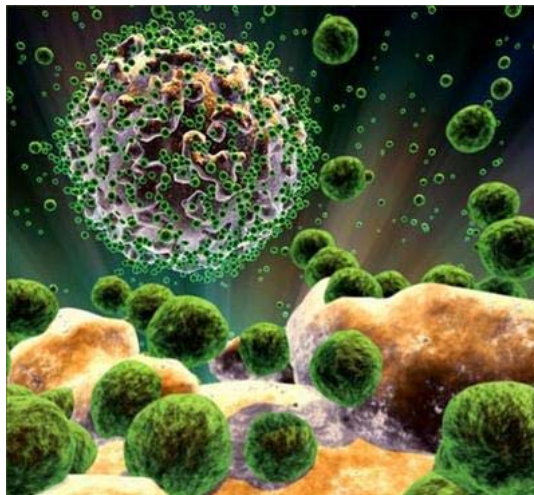


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΟΛΟΓΙΑΣ
(Διευθυντή: Καθηγητής Δ.Α. Σπαντιδος)**

**ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ HIV-1



ΠΟΡΙΧΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

“To myself I seem to have been only like a boy playing on the sea-shore whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me.”

Sir Isaac Newton 1643-1727

Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν στην πραγματοποίηση της. Ειδικότερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δ.Α. Σπαντίδο για την επιστημονική καθοδήγηση και ηθική συμπαράσταση που επέδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Κραμποβίτη στο εργαστήριο του οποίου πραγματοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος της διατριβής. Με την σωστή του καθοδήγηση και την συνεχή επίβλεψη στο επιστημονικό μου έργο, τον θεωρώ επιστημονικό μου δάσκαλο, που μέσα από ατέλειωτες επιστημονικές συζητήσεις, και μερικές αντιπαραθέσεις, με βοήθησε να ωριμάσω τόσο επιστημονικά όσο και σαν άνθρωπος. Χωρίς την αμέριστη προσοχή του και την επιστημονική του διαύγεια θα ήταν αδύνατον να σχεδιαστεί και να ολοκληρωθεί η παρούσα διδακτορική διατριβή.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της επταμελούς επιτροπής, καθηγητή Γ. Σαμώνη, Αν. καθηγητή Α. Ηλιόπουλο για την προθυμία τους να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της παρούσας διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αν. καθηγητή Α. Τσατσάκη που ως μέλος της τριμελούς μου επιτροπής με βοήθησε, με την συμβουλευτική του επιρροή, στην ολοκλήρωση της διατριβής, και τον Επ. καθηγητή Γ. Σουρβίνο για την άψογη συνεργασία και καθοδήγηση. Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Επ. καθηγητή Α. Ζαφειρόπουλο τόσο για τις επιστημονικές του συμβουλές, που ήταν καθοριστικές για την πορεία του διδακτορικού, όσο και για την φιλική του συμπαράσταση κατά την διάρκεια της διατριβής μου.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου της Κρήτης για την άψογη συνεργασία και φιλική υποστήριξη. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους: Γ. Σουφλα, Σ. Μπαριτάκη, Π. Κανέλου, Γ. Δημητροπούλου.

Ειδικότερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη, πρώην και νύν, του εργαστηρίου Εφαρμοσμένης Βιοτεχνολογίας και Ανοσολογίας στο IMBB, ΙΤΕ και ιδιαίτερα τους Α. Μώρου, Μ. Σιουμπάρα, και τα “παιδιά” μου Α. Οροκληνιώτη, Β. Ρίζου, Μ. Καραγεωργή, Σ. Τριλιράκη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την “κολώνα” του εργαστηρίου, τη Χαρούλα, που μαζί ξεπεράσαμε κάθε εργαστηριακό σκόπελο και την

ευχαριστώ που μου συμπαραστάθηκε τόσο ψυχολογικά όσο και ηθικά σε όλες τις δύσκολες και ευχάριστες στιγμές.

Θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ στους φίλους που μου συμπαραστάθηκαν και έδωσαν χρώμα σε αυτό το ταξίδι. Μιχάλη Βερυκοκάκη, Έφη Καράτζαλη, Δημήτρη Κουτσιούλη, Μιχάλη Χολέβα, Σάνυ Παπανίκου, Γιάννη Βόγλη, Νίκο Παπανικολάου, Βασίλη Μπαούση, Παντελή Χατζή, Μάγδα Νάκου, Ευα Παπαδημητράκη...Σας ευχαριστώ.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω και να αφιερώσω την διδακτορική μου διατριβή στην οικογένεια μου, τον πατέρα μου Βασίλη, την μητέρα μου Βασιλική και την αδερφή μου Μαρίνα για την αμέριστη αγάπη και κατανόηση αλλά και για όλα όσα μου έχουν προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια.

Καληνύχτα και καλή τύχη.....

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
SUMMARY	iv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Γενικά για την μόλυνση του ιού HIV	2
1.1.2 Μορφολογία του ιού HIV	3
1.1.3 Κυτταρικός τροπισμός	5
1.1.4 Είσοδος του ιού στα κύτταρα	7
1.1.5 Βιολογικός κύκλος του ιού	9
1.1.6 Παθογένεια του ιού	12
1.1.7 Ελάττωση του αριθμού των CD4 T κυττάρων	14
1.1.8 Δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος	16
1.1.9 Αντιρετροϊκή θεραπεία της μόλυνσης HIV	17
1.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ	19
1.2.1 Αντιγονοπαρουσίαση	19
1.2.2 Εντεροτοξίνη A	23
1.2.3 Απόπτωση κυττάρων	25
1.2.4 Κυτταρικός θάνατος επαγόμενος από ενεργοποίηση	28
1.3 ΣΚΟΠΟΙ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	32
2.1 Κυτταρικό υλικό	33
2.1.1 Θρεπτικά υλικά	33
2.2 Πεπτίδια	34
2.3 Παρασκευή λιποπεπτιδίων και λιποσωμάτων	35
2.4 Απομόνωση περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος	36
2.5 Απομόνωση CD8 κυττάρων με μαγνητικό διαχωρισμό	37
2.6 Μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων με ενσωμάτωση [³ H] θυμιδίνης	37
2.7 Φαινοτυπικός προσδιορισμός κυττάρων με κυτταρομετρία ροής	38
2.8 Μέτρηση απόπτωσης	39

2.9	Μετρήσεις ενδοκυτταρικού ασβεστίου στον κυτταρομετρητή ροής	40
2.10	Αλληλεπίδρασης του V3 πεπτιδίου με τους υποδοχείς χημειοκινών	41
2.11	Ημιποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου	41
2.12	Απομόνωση ολικού RNA από πρωτογενή λεμφοκύτταρα	43
2.13	Μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ 45

3.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ V3 ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΟΥ HIV-1 ΣΤΑ T ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΓΕΝΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ 46

3.1.1	Εισαγωγή	47
3.1.2	Επίδραση της V3 περιοχής κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης	48
3.1.3	Μέτρηση της απόπτωσης των T κυττάρων	52
3.1.4	Φαινοτυπική ανάλυση των CD4 T κυττάρων	53
3.1.5	Μελέτη της επίδρασης της ιντερλευκίνης 2 στο φαινόμενο του V3	56
3.1.6	Μελέτη της επίδρασης της ιντερλευκίνης 4	60

3.2 Μελέτη της αλληλεπίδρασης του V3 πεπτιδίου με τους υποδοχείς των κυττάρων 61

3.2.1	Εισαγωγή	62
3.2.2	Αλληλεπίδραση V3 πεπτιδίων με πρωτογενή κύτταρα	62
3.2.3	Αλληλεπίδραση V3 πεπτιδίων με τους υποδοχείς χημειοκινών	63
3.2.4	Πειράματα αναστολής του V3 φαινομένου	64

3.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΤΟΥ V3 ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ 69

3.3.1	Εισαγωγή	70
3.3.2	Μέτρηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου	70
3.3.3	Μέτρηση της επιφανειακής εκφράσεις του FAS υποδοχέα σε περιφερικά κύτταρα	72
3.3.4	Μέτρηση των επιπέδων mRNA του μεταγραφικού παράγοντα Yin Yang 1	73
3.3.5	Μετρήσεις των επιπέδων mRNA της ιντερλευκίνης 2	74
3.3.6	Φαινοτυπική ανάλυση των CD4/CD45RO κυττάρων 8 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων με το υπερ-αντιγόνο	76
3.3.7	Μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA	77
3.3.8	Μετρήσεις των επιπέδων mRNA του μεταγραφικού παράγοντα NFAT5	84
3.3.9	Μετρήσεις των επιπέδων mRNA του Kras	86

3.3.10	Μελέτη της έκφρασης του CD38 υποδοχέα	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4		
ΣΥΖΗΤΗΣΗ		90
4.1	Το V3 φαινόμενο στην γενικευμένη αντιγονοπαρουσίαση	91
4.2	Ενδοκυτταρικά μονοπάτια	96
4.2.1	Μεταγραφικός παράγοντας NFAT5	97
4.2.2	Υποδοχέας CD38	98
4.3	Προτεινόμενος μηχανισμός	100
4.4	Θεραπευτικές προεκτάσεις του V3 φαινομένου	103
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	106
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ		125
Βιογραφικό σημείωμα		
Επιστημονικές Δημοσιεύσεις		

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) είναι ο αιτιολογικός παράγοντας για την επίκτητη ανοσολογική ανεπάρκεια (AIDS). Το κύριο χαρακτηριστικό της μόλυνσης με τον ιό είναι η ελάττωση των μη μολυσμένων ενεργοποιημένων/αναμνηστικών CD4/CD45RO T κυττάρων κατά την ασυμπτωματική φάση που οδηγεί στην δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο ακριβής μηχανισμός της ελάττωσης των CD4 T κυττάρων δεν είναι ακόμα κατανοητός παρόλο που αρκετοί ιικοί παράγοντες έχουν προταθεί να επάγουν τον θάνατο των κυττάρων.

Προκειμένου να διερευνηθεί η παθογένεση του HIV και να ερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίον προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση των ενεργοποιημένων/αναμνηστικών CD4/CD45RO T κυττάρων αναπτύξαμε ένα *in vitro* σύστημα χρησιμοποιώντας ανθρώπινα πρωτογενή κύτταρα από υγιείς δότες. Εφόσον η κύρια λειτουργία αυτών των κυττάρων είναι η αλληλεπίδραση τους με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μελετήσαμε την παθογένεια του HIV από μια καθαρά ανοσολογική σκοπιά. Προγενέστερες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας έδειξαν ότι κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης η τρίτη μεταβλητή (V3) περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης gp120 όταν βρίσκεται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, αλληλεπιδρά τουλάχιστον με τον υποδοχέα χημειοκινών CCR5 στην επιφάνεια των T κυττάρων, και προκαλεί κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση στα απαντώντα T κύτταρα. Ως αντιγόνο, για την ενεργοποίηση των κυττάρων, είχε χρησιμοποιηθεί το τοξοειδές του τετάνου με μια συχνότητα 1 στα 10^5 - 10^6 T κύτταρα.

Κεντρικός στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να εντοπιστούν τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια που μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο V3 φαινόμενο. Το πρώτο μέρος της μελέτης ήταν να αντικατασταθεί το τετανοειδικό σύστημα, λόγω της μικρής συχνότητας των απαντούντων T κυττάρων, από το υπερ-αντιγόνο SEA το οποίο ενεργοποιεί περίπου το 25% των CD4 T κυττάρων. Μελέτες πολλαπλασιασμού και μετρήσεις της απόπτωσης των κυττάρων έδειξαν ότι το V3 φαινόμενο διατηρείται στο σύστημα του SEA. Φαινοτυπικός προσδιορισμός με

κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι ο κύριος υποπληθυσμός των T κυττάρων είναι τα CD4/CD45RO T κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα CCR5 και αντιστοιχούν στον υποπληθυσμό των T κυττάρων που ελαττώνεται κατά την ασυμπτωματική φάση της HIV μόλυνσης. Πειράματα βελτιστοποίησης του φαινομένου συμπεριέλαβαν την απομόνωση των CD8 T κυττάρων από τα PBMC, και την επώαση των κυττάρων με ιντερλευκίνη-2 (IL-2) και ιντερλευκίνη-4 (IL-4). Εξαιτίας του τρόπου δράσης του υπερ-αντιγόνου η επώαση των κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και των CD8 και των CD4 T κυττάρων. Απομόνωση των CD8 κυττάρων από τα PBMC βελτιστοποίησε το V3 φαινόμενο ενισχύοντας προηγούμενες παρατηρήσεις ότι το φαινόμενο παρατηρείται μόνο στα CD4 T κύτταρα. Επώαση των κυττάρων με IL-2, αλλά όχι με IL-4, ενίσχυσε τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων.

Περαιτέρω πειράματα για τον εντοπισμό των ενδοκυτταρικών μονοπατιών του V3 φαινομένου έδειξαν αύξηση του υποδοχέα της ιντερλευκίνης-2, CD25, και του υποδοχέα Fas (CD95). Και οι δύο υποδοχείς θεωρούνται ως μάρτυρες ενεργοποίησης των T κυττάρων, όταν αυτά ενεργοποιηθούν από την αναγνώριση κάποιου αντιγόνου, και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων. Μέτρηση των επιπέδων mRNA του μεταγραφικού παράγοντα YY1, ο οποίος εκτός των άλλων ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των υποδοχέων Fas και CCR5, έδειξε μείωση των επιπέδων του. Επίσης κινητική ανάλυση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου έδειξε αυξημένα επίπεδα ασβεστίου σε χρονικές περιόδους που παρατηρείται αύξηση του υποδοχέα Fas και της μέγιστης απόπτωσης. Η ισορροπία μεταξύ πολλαπλασιασμού και απόπτωσης είναι πολύ εύθραυστη και παρόλο που αύξηση των επιπέδων ασβεστίου είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των κυττάρων, παρατεταμένη αύξηση οδηγεί στην απόπτωση των κυττάρων.

Για να ερευνήσουμε τα πρωταρχικά σηματοδοτικά μονοπάτια που προκαλούν το V3 φαινόμενο πραγματοποιήθηκαν μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ανέδειξε 378 γονίδια με αυξημένα και 61 με μειωμένα επίπεδα RNA ($p \leq 0.05$). Η πλειοψηφία των γονιδίων σχετίζεται με ενεργοποίηση των κυττάρων και αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Από αυτά ο μεταγραφικός παράγοντας nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5), ο οποίος εκτός των άλλων εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των T κυττάρων κατά την διέγερση τους από

αντιγονικά ερεθίσματα, παρουσίασε σημαντικό ενδιαφέρον και τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών επαληθευτήκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Επίσης φαινοτυπική ανάλυση επαλήθευσε τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών και για τον υποδοχέα CD38. Ο υποδοχέας CD38 σχετίζεται με την αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου και τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα στα CD4/CD45RO T κύτταρα σε χρονικές περιόδους που παρατηρείται αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου και μέγιστη απόπτωση.

Η κατανόηση του μηχανισμού παθογένειας του ιού HIV συμβάλει στον αποτελεσματικότερο σχεδιασμό αντιρετροϊκής θεραπείας. Σε αυτό το μήκος κύματος συνθετικά πεπτίδια με 9 αρνητικά φορτισμένα πεπτίδια ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που προκλήθηκε από το V3 φαινόμενο και ενδεχομένως να αποτελέσουν μελλοντικό εργαλείο για την αποτελεσματική καταπολέμηση της HIV μόλυνσης.

SUMMARY

The human immunodeficiency virus (HIV) is responsible for the development of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The hallmark of the HIV infection is the depletion of memory/effector CD4/CD45RO T cells during the asymptomatic phase that leads to the deregulation of the immune system. The exact mechanism of CD4 T lymphocyte depletion is not well understood. Although several hypotheses have been proposed to explain this aspect of HIV pathogenesis, the prevailing theory is that chronic activation of the immune system by the HIV infection causes exhaustion of CD4 T cells that die by activation induced cell death (AICD).

In order to investigate the mechanism by which HIV generates AICD to memory/effector CD4/CD45RO T cells we developed an *in vitro* system using human primary cells isolated from healthy donors. Since the major role of memory/effector CD4/CD45RO T cells is to recognize antigens on antigen presenting cells (APC) and regulate the appropriate immune response, we studied the pathogenic mechanism from an immunological point of view. We investigated the effects of the third hypervariable region (V3) of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 during the antigen presentation process. Using composite liposome particles with exposed V3 synthetic lipopeptides, we demonstrated that during antigen presentation, when the V3 epitope was present on the surface of APC, interacted at least with the chemokine receptor CCR5, causing enhanced proliferation followed by sharp apoptosis of the responding T lymphocytes.

The main objective of the present study was to identify the intracellular signals generated by the V3 phenomenon. The responding tetanus-specific memory CD4/CD45RO T cells have an anticipated frequency in the order of 1 in 10^5 - 10^6 T cells. This low frequency was considered unsuitable for the required intracellular signaling studies and the V3 phenomenon had to be adapted using a more general antigen induced activation system. For this reason the first part of this study dealt with the replacement of the tetanus specific model by a superantigen (SEA) that activates up to 25% of CD4 T cells to provide evidence that the V3 phenomenon occurred in the new system. Proliferation and apoptosis studies indicated that in the presence of SEA, V3 generated AICD. Phenotypic analysis of the cells confirmed that the main population affected was

the CD4/CD45RO T cells that express the chemokine receptor CCR5 and are reported to be the target cell population of HIV during the asymptomatic phase. Removal of CD8 cells, as SEA activates both CD4 and CD8 cells, improved the observed V3 phenomenon in terms of both clarity and repeatability indicating that this phenomenon is restricted to CD4 cells. Addition of IL-2, but not IL-4, further improved the proliferation and the apoptosis of the responding cells. PBMCs incubated with IL-2 in the absence of SEA were also affected by the presence of V3 indicating a possible involvement of IL-2 in the V3 phenomenon.

Further experiments were conducted in order to identify other cell surface receptors for signal transduction. Our results showed an increase in the percentage of cells expressing the IL-2 receptor, CD25, and the Fas receptor (CD95). Both receptors are considered to be activation markers of antigen responding T cells and are involved in the proliferation (CD25) and apoptosis (CD95) of T cells. In the same context, measurements of intracellular calcium indicated that the presence of V3 increased the calcium levels at time points where maximum apoptosis and Fas expression were observed. Proliferation and apoptosis are dynamics states and although increase of intracellular calcium is required for cell proliferation, sustained increase may also lead to AICD.

We finally investigated mRNA expression level changes in CD4 T cells after exposing them to the above described SEA-V3 liposome system in relation to SEA-plain liposome control. cDNA products were assessed by microarray analysis (Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array) with a panel of 47.500 transcripts of which 38.500 were genes of the human genome. Changes ≥ 2 ($p \leq 0.05$) were considered as significant. Our results showed that 378 genes were up-regulated and 61 genes down-regulated. The major clusters of these genes are involved in the activation of T cells and the increase in intracellular calcium levels. Nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5), which is a transcription factor involved in the activation of T lymphocytes during antigen presentation, showed an 18-fold increase in mRNA levels is considered to have a crucial role in the activation of T cell induced by the V3 phenomenon. The microarray results were further evaluated by real time PCR that verified the increase in the mRNA levels of NFAT5. Up-regulation of CD38 gene, which is involved in increasing the intracellular calcium levels, was verified by phenotypic analysis on CD4/CD45RO T cells that showed

increased levels of CD38 expression at time points where increased levels of intracellular calcium and maximum apoptosis were observed.

The above results indicated a possible mechanism for the V3 phenomenon. During antigen presentation, V3 peptides positioned on the surface of APC, interact with at least the chemokine receptor CCR5 on the surface of CD4 T cells and generate AICD. Because of the position of the V3 peptides on the surface of APC and the ionic interaction between the V3 peptides and the CCR5 chemokine receptor, it is believed that this interaction strengthens the contact between APC and T cells, and prolongs the duration of antigen presentation. This generates enhanced activation signaling on T cells with subsequent increase in intracellular calcium that leads to the activation of NFAT5 transcription factor. NFAT5 activates T cells leading to enhanced proliferation and expression of activation markers such as CD25, CD38, CD95 and increased levels of intracellular calcium. The abnormal enhanced activation produced by prolonged signaling during the antigen presentation leads to the cell death of CD4 T cells by AICD.

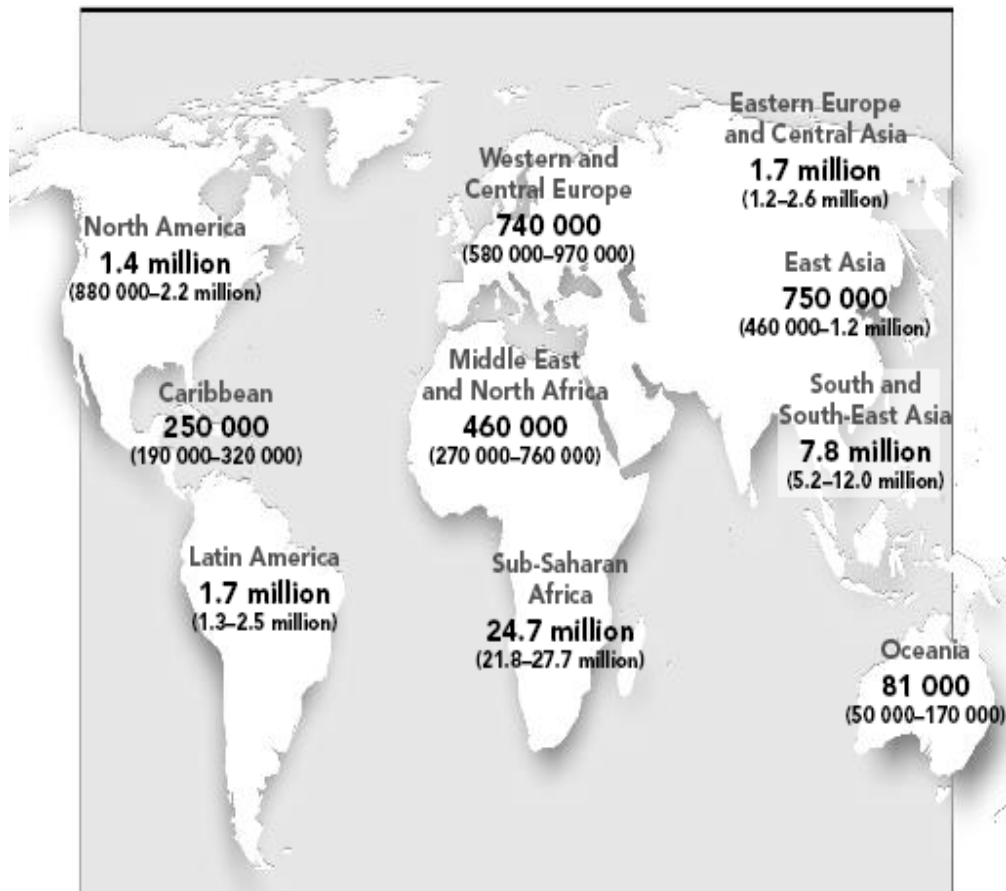
Understanding the pathogenesis of HIV is crucial for the rational design of more effective antiretroviral therapy. In this sense, the use of synthetic peptides with positively charged amino acids that inhibited cell proliferation caused by the V3 phenomenon may prove to be a useful tool for the battle against HIV. Additionally identification of the key factors in the signal transduction system of the cells that are modulated by HIV may assist in recognizing new therapeutic targets.

1.Εισαγωγή

1.1 Γενικά για την μόλυνση του HIV

Το σύνδρομο της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας (AIDS) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1981 στις ΗΠΑ, και τα πρώτα ισσωμάτια του HIV (human immunodeficiency virus) απομονώθηκαν 2 χρόνια αργότερα, εγκαινιάζοντας μια νέα εποχή στην μάχη ενάντια στους παθογόνους ιούς (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983) (Gallo, Sarin et al. 1983). Σύμφωνα με το Πρόγραμμα Ηνωμένων Εθνών για το AIDS, σήμερα αναφέρονται περίπου 39.5 εκατομμύρια άνθρωποι μολυσμένοι με τον ιό του HIV και η πλειοψηφία αυτών (63%) εντοπίζεται στις υπο-Σαχάριες περιοχές της Αφρικής (Εικ. 1.1). Στον Ελλαδικό χώρο, σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, ο συνολικός αριθμός HIV οροθετικών ατόμων μέχρι τα τέλη του Οκτωβρίου του 2006 ανέρχεται σε 8080, εκ των οποίων περίπου 80% είναι άνδρες. Σε παγκόσμιο επίπεδο υπολογίζεται ότι μέσα στο 2006 μολύνθηκαν 4.3 εκατομμύρια άνθρωποι ενώ πέθαναν περίπου 2.9 εκατομμύρια ασθενείς, εκ των οποίων 380 χιλιάδες παιδιά, καθιστώντας το AIDS την τέταρτη αιτία θανάτου παγκοσμίως.

Ο ιός HIV ανήκει στην οικογένεια των *Retroviridae* το γένος των *Lentivirus*, και αποτελείται από 2 κύρια είδη, τον HIV-1 και τον HIV-2, τα οποία παρουσιάζουν 40% ομολογία στο γένωμα τους αλλά διαφέρουν τόσο στις μορφολογικές όσο και στις λειτουργικές τους ιδιότητες. Ο HIV-1 είναι το επικρατέστερο από τα δύο είδη στις μολύνσεις που παρατηρούνται στον δυτικό κόσμο, και υπάρχει ένας συνεχώς αυξανόμενος κατάλογος υποτύπων (υπότυποι A έως F και η ομάδα O). Η μόλυνση με τον HIV προκαλεί σοβαρές δυσλειτουργίες στο ανοσοποιητικό σύστημα που οδηγούν στην εκδήλωση του AIDS, με τον οργανισμό να γίνεται επιρρεπής σε ευκαιριακές λοιμώξεις και σε ανάπτυξη νεοπλασμάτων, ενώ παράλληλα εμφανίζονται μεταξύ των άλλων και αρνητικές επιπτώσεις στο νευρικό, στο αιμοποιητικό και αναπνευστικό σύστημα.



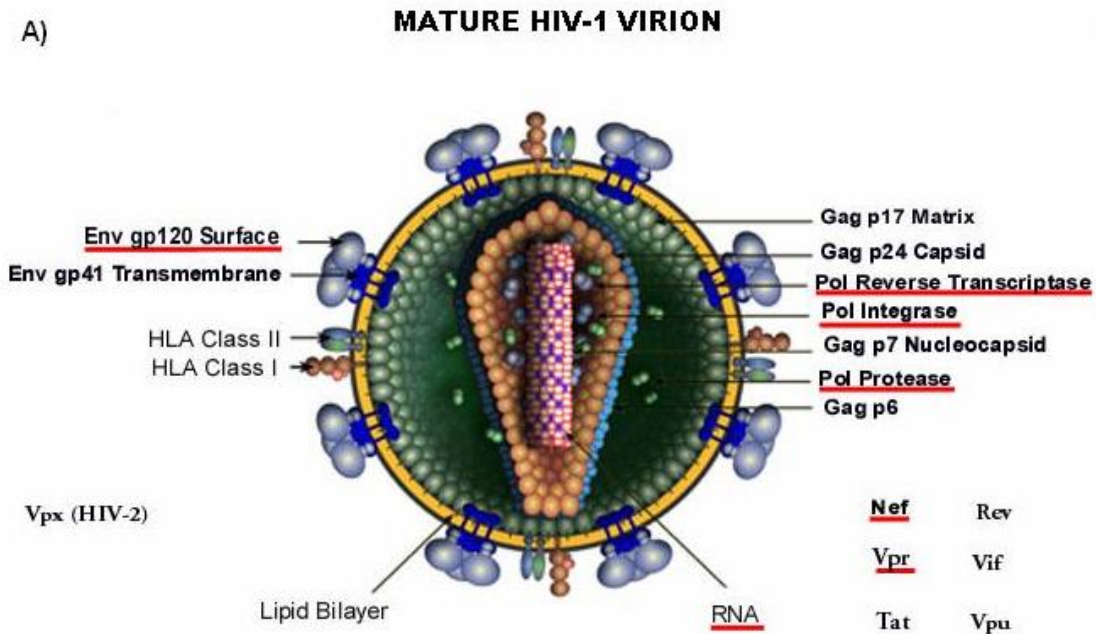
Εικ. 1.1. Πληθυσμιακή κατανομή των εκτιμώμενων φορέων του HIV παγκοσμίως (πηγή : Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας, WHO)

1.1.2 Μορφολογία του ιού HIV

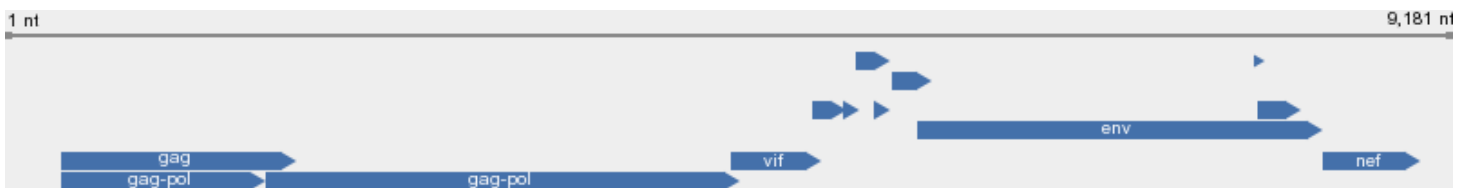
Το ισωμάτιο του ιού HIV, παρατηρούμενο σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έχει σχεδόν εικοσαεδρική σφαιρική δομή με διάμετρο 100-150nm και αποτελείται από το καψίδιο, το νουκλεοκαψίδιο, 2 μόρια μονόκλωνου RNA ως γενετικό υλικό και τον ικό φάκελο. Ο φάκελος αποτελείται από μια λιπιδιακή διπλοστοιβάδα προερχόμενη από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή και περιέχει κυρίως 2 γλυκοπρωτεΐνες του

ιού, την gp41 και την gp120. Οι γλυκοπρωτεΐνες αυτές προέρχονται από τον κατακερματισμό μιας μεγάλης προ-πρωτεΐνης, την gp160, και είναι υπεύθυνες για την είσοδο του ιού στα κύτταρα και τον σχηματισμό συγκυτίων. Εκτός των άλλων, ο ιικός φάκελος περιέχει και πρωτεΐνες από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή όπως αντιγόνα του κυρίου συμπλόκου μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης I και II, τα μόρια CD28 και B7-2 (Arthur, Bess et al. 1992) (Bounou, Dumais et al. 2001) (Cantin, Fortin et al. 1997)(Εικ. 1.2A). Το στρώμα του ιού αποτελείται από 3 δομικές πρωτεΐνες, την p24, την p17 και την p9, εκ των οποίων η p17 ενώνεται με τον φάκελο του ιού, η p24 σχηματίζει το καψίδιο μέσα στο οποίο είναι κλεισμένα τα 2 μόρια RNA και τα ιικά ένζυμα, και η p9 είναι ένα νουκλεοκαψίδιο προσκολλημένο στα μόρια RNA (Chinen and Shearer 2002).

Το γονιδίωμα του ιού HIV είναι περίπου 9,2 Kbp και περιέχει ανοικτά πλαίσια διαβάσματος (ORFs) τα οποία κωδικοποιούν για τις διάφορες πρωτεΐνες του ιού (Εικ. 1.2B). Το πρωταρχικό μετάγραφο είναι ένα μόριο mRNA το οποίο μεταγράφεται στις προ-πρωτεΐνες Gag και Pol οι οποίες μετά από πρωτεολυτικό κατακερματισμό σχηματίζουν τις δομικές (p25, p17, p9 και p6) και ενζυμικές (αντίστροφη μεταγραφάση (RT), την ιντεγκράση (IN) και τις πρωτεάσες (PR)) πρωτεΐνες αντίστοιχα (Wu and Marsh 2003). Εκτός αυτών, ο HIV διαθέτει 6 ρυθμιστικές πρωτεΐνες, την Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr και Vpr. Η Tat και η Rev ρυθμίζουν την ιική μεταγραφή καθώς η Tat λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας και η Rev μεταφέρει τα μη ματισμένα RNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Strebel 2003). Η Vif ενισχύει την μολυσματικότητα του ιού, ενώ η Vpr, ρυθμίζει την διαδικασία της συγκρότησης των καινούργιων ισωματίων και η Vpr την μεταφορά του νουκλεοκαψιδίου στον πυρήνα (Hout, Mulcahy et al. 2004) (Le Rouzic and Benichou 2005). Τέλος η Nef παρουσιάζεται σαν μία πολυλειτουργική πρωτεΐνη που εκτός των άλλων ευνοεί την μολυσματικότητα του ιού καθώς προκαλεί μείωση της έκφρασης του υποδοχέα CD4 και του μεγίστου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τάξης II (Fackler, Alcover et al. 2007) (Geyer, Fackler et al. 2001).



B)



Εικ 1.2. A) Η δομή ενός ώριμου HIV-1 ιοσωματίου, B) Το γονιδίωμα του ιού HIV

1.1.3 Κυτταρικός τροπισμός

Ο ιός HIV μεταδίδεται κυρίως κατά την σεξουαλική επαφή αφού ιοσωμάτια μπορούν να περάσουν το επιθηλιακό βλενογόνο και να μολύνουν συγκεκριμένα κύτταρα που έχουν σαν κύριο χαρακτηριστικό την έκφραση του υποδοχέα CD4 (μακροφάγα/μονοκύτταρα και ένα υποσύνολο των T-κυττάρων) (Bomsel 1997) (Ullrich, Schmidt et al. 1998) (Dalglish, Beverley et al. 1984) (Klatzmann, Champagne et al.

1984). Παρόλο που αρχικές μελέτες υποστήριζαν ότι ο υποδοχέας CD4 είναι ο μοναδικός υποδοχέας που χρησιμοποιείται από τον HIV-1, μεταγενέστερες μελέτες απόδειξαν ότι είναι απαραίτητη η ύπαρξη συνυποδοχέων για την επιτυχημένη είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή (Rucker, Samson et al. 1996; Moore, Trkola et al. 1997). Επικρατέστεροι συνυποδοχείς για την είσοδο του ιού είναι οι υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4, ενώ παράλληλα έχουν προταθεί και άλλοι ο οποίοι όμως χρησιμοποιούνται από λιγιστά στελέχη του HIV και είναι υπό διερεύνηση (Berson, Long et al. 1996) (Deng, Liu et al. 1996) (Roderiquez, Oravec et al. 1995; Dragic, Litwin et al. 1996).

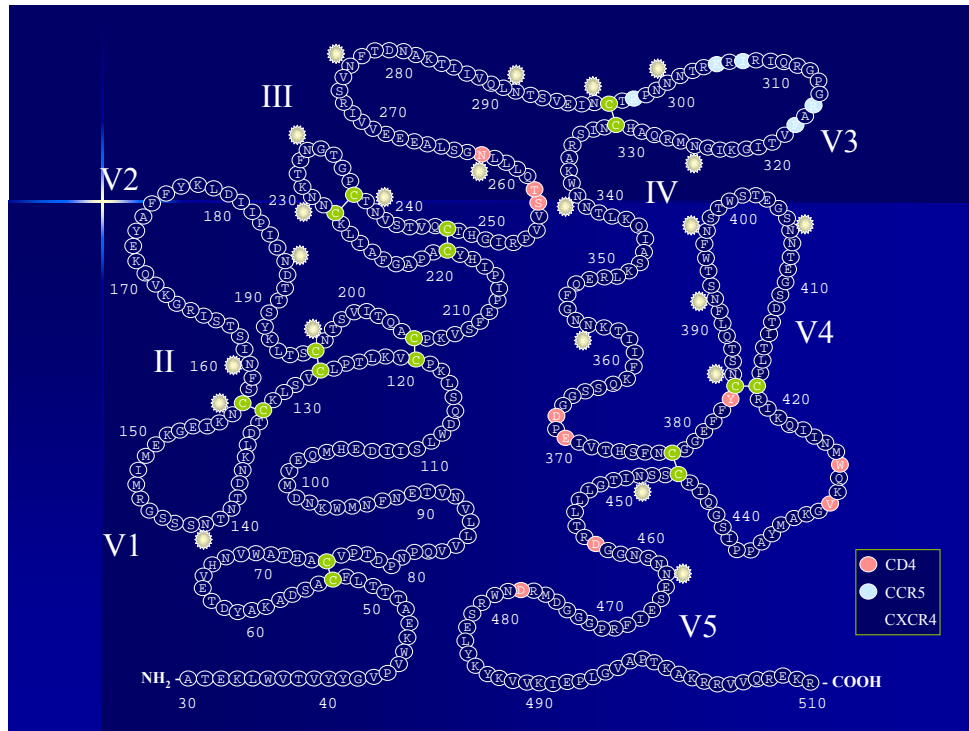
Ο καθορισμός του τροπισμού, δηλαδή ποια κύτταρα θα μολυνθούν από τα διάφορα ιικά στελέχη, καθορίζεται από την προσδετική προτίμηση που δείχνουν στους συνυποδοχείς. Στελέχη του ιού που χρησιμοποιούν τον CXCR4 υποδοχέα ονομάζονται T-τροπικά (X4) και μολύνουν κυρίως T κύτταρα. Αντιθέτως στελέχη του ιού που χρησιμοποιούν τον CCR5 υποδοχέα ονομάζονται M-τροπικά (R5) και μολύνουν κυρίως μακροφάγα. Επιπλέον έχουν αναφερθεί στελέχη που μπορούν να χρησιμοποιήσουν και τον CCR5 και τον CXCR4 υποδοχέα, και ονομάζονται dual-tropic. Ο πρωταρχικός στόχος του ιού κατά την μετάδοση από άτομο σε άτομο είναι τα μακροφάγα του επιθηλιακού βλεννογόνου και επομένως τα R5 στελέχη επικρατούν στα αρχικά στάδια της μόλυνσης (van't Wout, Kootstra et al. 1994). Για αυτό τον λόγο μεταλλάξεις στον CCR5 υποδοχέα αναστέλλουν την μόλυνση των κυττάρων με τον HIV χωρίς να υπάρχουν επιπτώσεις στα κύτταρα αφού πιστεύεται ότι άλλοι υποδοχείς χημειοκινών καλύπτουν την βιολογική δράση του CCR5 (Moore 1997). Αν και υπάρχουν αρκετές εξαιρέσεις (Schuitemaker, Koot et al. 1992; de Roda Husman, van Rij et al. 1999), κατά κανόνα η μετάβαση των ιικών στελεχών που χρησιμοποιούν το CCR5 υποδοχέα σε εκείνα που χρησιμοποιούν τον CXCR4 συνυποδοχέα έχει συνδεθεί με τη μετάβαση από τη λανθάνουσα ασυμπτωματική φάση στις κλινικές εκδηλώσεις που συνδέονται με το AIDS (Richman and Bozzette 1994; Bjorndal, Sonnerborg et al. 1999).

1.1.4 Είσοδος του ιού στα κύτταρα

Η είσοδος του ιού στα κύτταρα περιλαμβάνει τρία διακριτά βήματα: 1) την αλληλεπίδραση του ιού με τον CD4 υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή, 2) την αλληλεπίδραση του ιού με τους συνυποδοχείς, και 3) την μεμβρανική σύντηξη του φακέλου του ιού με την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή. Το κύριο μόριο για την επιτυχή έκβαση των δύο πρώτων βημάτων είναι η γλυκοπρωτεΐνη gp120 η οποία βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνια του ιικού φακέλου και προέρχεται από τον πρωτεολυτικό κατακερματισμό της προ-πρωτεΐνης gp160 σε δύο λειτουργικές πρωτεΐνες την gp120 και την gp41. Οι δύο πρωτεΐνες γλυκοζηλιώνονται στο σύμπλεγμα Golgi και στην συνέχεια μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη όπου θα αποτελέσουν στην συνέχεια δομικό συστατικό του φακέλου του ιού κατά την έξοδο του από το κύτταρο (Leonard, Spellman et al. 1990). Ο ιικός φάκελος περιέχει τριμερή που αποτελούνται από ετεροδιμερή της gp120-gp41, όπου η gp41 είναι το διαμεμβρανικό κομμάτι και η gp120 το εξωμεμβρανικό ιικό φάκελο (Yang, Farzan et al. 2000) (Εικ. 1.2).

Η gp120 αποτελείται από 5 μεταβλητές (V1-V5) και 5 συντηρημένες περιοχές (C1-C5) (Farzan, Choe et al. 1998). Η πρόσδεση της γλυκοπρωτεΐνης gp120 στον CD4 υποδοχέα επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπίδρασης συγκεκριμένων συντηρημένων αμινοξέων της πρωτεΐνης (Εικ. 1.3) με την δεύτερη συμπληρωματική-καθοριστική περιοχή (second complementary-determining region, CDR2) του CD4 (Olshevsky, Helseth et al. 1990; Kwong, Wyatt et al. 1998). Από μόνη της αυτή η αλληλεπίδραση δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει την είσοδο του ιού στα κύτταρα, αλλά είναι σημαντική για την αναγνώριση του κυττάρου στόχου και για να αυξήσει την συγγένεια σε άλλα ιικά συστατικά για την πρόσδεση με τους συνυποδοχείς. Η πρόσδεση της gp120 με τον CD4 υποδοχέα προκαλεί αλλαγή στην χωροδιάταξη της δομής της gp120 έτσι ώστε η μεταβλητές περιοχές V1/V2 μετακινούνται προκαλώντας την προεκβολή της τρίτης μεταβλητής V3 (Sullivan, Sun et al. 1998). Η τρίτη μεταβλητή περιοχή V3 της gp120 είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση του ιού με τους συνυποδοχείς και παρόλο που ο ακριβής μηχανισμός της αλληλεπίδρασης δεν είναι πλήρως κατανοητός, έχει βρεθεί ότι η αλληλεπίδραση της V3 περιοχής με τον υποδοχέα χημειοκινών CCR5 είναι ιοντικής φύσεως (Baritaki, Zafiroopoulos et al. 2002). Πιο συγκεκριμένα, θετικά φορτισμένα

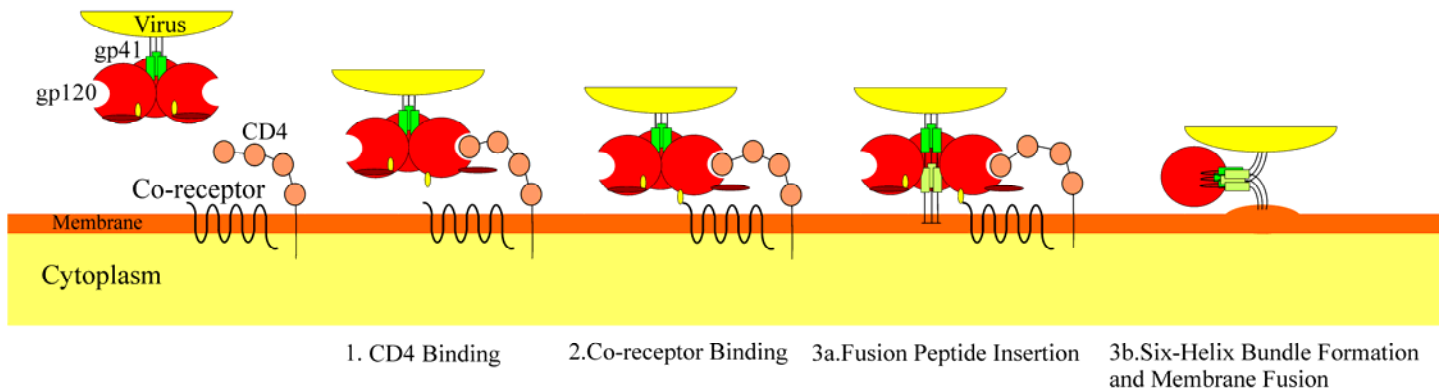
αμινοξέα της τρίτης μεταβλητής περιοχής της gp120 φαίνεται να αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά σουλφουρωμένα αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο του CCR5.



Εικ. 1. 3. Δομή της γλυκοπρωτεΐνης gp120 του ιού HIV-1.

Το τελευταίο στάδιο για την είσοδο του ιού στα κύτταρα είναι η σύντηξη των μεμβρανών του φακέλου και της κυτταρικής μεμβράνης. Η gp41 είναι υπεύθυνη για την σύντηξη των μεμβρανών και αποτελείται από τρεις κύριες περιοχές: την ενδοκυτταρική, την διαμεμβρανική και την εξωκυττάρια. Η ενδοκυτταρική περιοχή είναι σημαντική για την σύντηξη και αποτελείται από μία υδροφοβική πεπτιδική αλληλουχία σύντηξης στο αμινοτελικό άκρο, δύο υδροφοβικά επαναλαμβανόμενα επταπεπίδια (HR1 και HR2) στο καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης, και μία περιοχή άρθρωσης όπου δημιουργούνται

δισουλφιδικοί δεσμοί ανάμεσα στα δύο υδροφοβικά επαναλαμβανόμενα επταπεπτίδια κατά την διάρκεια της σύντηξης (Bernstein, Tucker et al. 1995) (Chambers, Pringle et al. 1990). Όταν η gp120 προσδέεται στον CD4 υποδοχέα συμβαίνουν περαιτέρω αλλαγές στην χωροδιάταξη της πρωτεΐνης που οδηγεί στην αποσύνδεση της gp41 από την gp120. Η gp41 ξεδιπλώνεται και η υδροφοβική πεπτιδική αλληλουχία σύντηξης προεκβάλλεται προς την μεμβράνη του κυττάρου. Η είσοδος του πεπτιδίου στην κυτταρική μεμβράνη προκαλεί επαναδίπλωση της gp41 σε δομή φουρκέτας (hairpin-like structure) έτσι ώστε τα δύο υδροφοβικά επαναλαμβανόμενα επταπεπτίδια να τοποθετούνται αντιπαράλληλα σχηματίζοντας μια δεσμίδα 6 ελίκων (6-helix bundle formation) (Lu, Blacklow et al. 1995) (Weissenhorn, Dessen et al. 1997)(Εικ. 1.4). Αυτή η δομή φουρκέτας πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την σύντηξη των μεμβρανών και την είσοδο του HIV στο κύτταρο ξενιστή.



Εικ. 1. 4. Σχηματική περιγραφή της εισόδου του ιού HIV-1 στο κύτταρο

1.1.5 Βιολογικός κύκλος του ιού

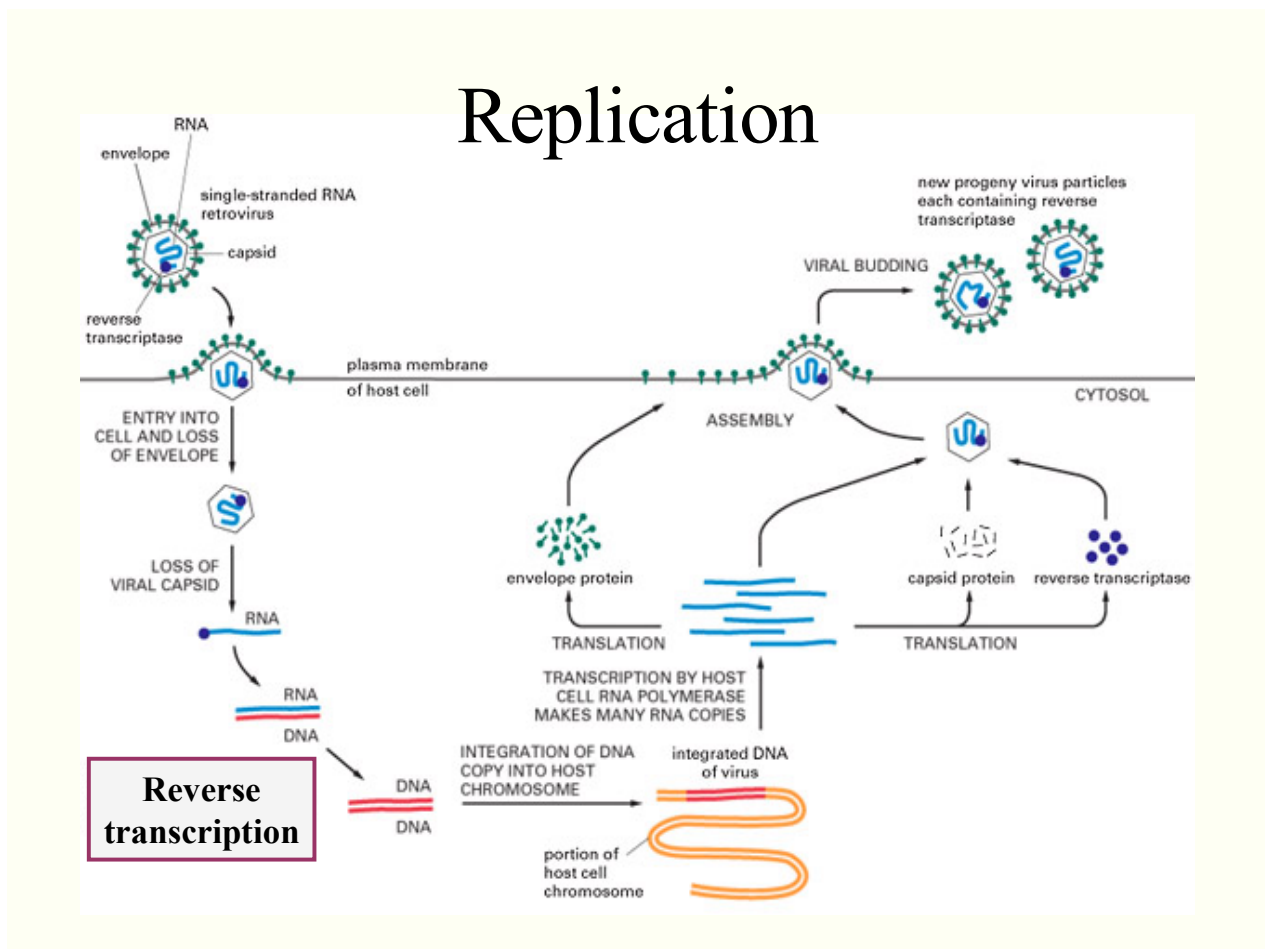
Η σύντηξη της μεμβράνης του φακέλου με την κυτταρική μεμβράνη και κατεπέκταση η είσοδος του ιού στο κύτταρο είναι το αρχικό στάδιο του βιολογικού

κύκλου του HIV. Αμέσως μετά την είσοδο του ιού το ιικό καψίδιο ελευθερώνει το γενωμικό RNA και όλες τις πρωτεΐνες μέσα στο κυτταρόπλασμα (Freed and Mouland 2006). Η αντίστροφη μεταγραφή του RNA στο συμπληρωματικό του DNA (cDNA) πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας μια κυτταρική λυσίνη tRNA σαν εκκινήτη υπό την επίδραση της ιικής RNA-εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης (αντίστροφη μεταγραφάση)(Cen, Khorchid et al. 2001). Κατά την διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής η πολυμεράση του ιού τοποθετεί 1 λανθασμένο νουκλεοτίδιο ανά 1500 με 4000 βάσεις, γεγονός που εξηγεί τον μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων (Tantillo, Ding et al. 1994). Στην συνέχεια το συμπληρωματικό DNA μεταφέρεται με την βοήθεια δύο ικών πρωτεϊνών, την Vpr και την Vif, στον πυρήνα του κυττάρου, όπου ενσωματώνεται με την βοήθεια της ιικής ιντεγκράσης (IN) στο DNA του ξενιστή(Farnet and Bushman 1996). Σε αυτήν την φάση ο ιός ονομάζεται προϊός και μπορεί να διατηρηθεί σε αυτήν την κατάσταση για αρκετό χρονικό διάστημα.

Μετά από την ενσωμάτωση του ιικού cDNA στο DNA του κυττάρου απαιτείται η παρουσία κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων για την έναρξη της μεταγραφής ορισμένων γονιδίων με την βοήθεια της κυτταρική RNA πολυμεράσης II. Τέτοιοι μεταγραφικοί παράγοντες είναι ο NF-kB, ο NFAT και ο AP-1. Έτσι εξηγείται η αυξημένη παραγωγή ισομάτων που παρατηρείται σε ενεργοποιημένα T κυρίως κύτταρα όπου οι συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες είναι λειτουργικά ενεργοί. Στην αρχή η μεταγραφή του ιικού DNA είναι μειωμένη και περιορίζεται στην δημιουργία μικρών ματισμένων mRNA που κωδικοποιούν τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες του ιού (Tat, Rev and Nef). Έκφραση της Tat πρωτεΐνης και η επακόλουθη πρόσδεση της στο 5' άκρο του ιικού DNA έχει ως αποτέλεσμα την επιστράτευση της κυτταρικής κυκλίνης T1 η οποία προκαλεί αύξηση της μεταγραφής κατά 1000 φορές (Parada and Roeder 1996; Wei, Garber et al. 1998).

Στην συνέχεια τα ιικά ματισμένα μετάγραφα mRNA μεταφέρονται από την Rev, με την βοήθεια της κυτταρικής πρωτεΐνης CRM-1, στο κυτταρόπλασμα όπου πραγματοποιείται η μετάφραση τους (Formerod, Ohno et al. 1997; Neville, Stutz et al. 1997). Με εξαίρεση το mRNA του *env* γονιδίου που η μετάφραση γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα υπόλοιπα μετάγραφα μεταφράζονται στα ριβοσώματα. Μετά τον πρωτεολυτικό κατακερματισμό της gp160 στις gp120 και gp41, ακολουθεί η

μεταφορά τους στην πλασματική μεμβράνη όπου και συμπλέκονται με τις πρόδρομες πρωτεΐνες Gag και Pol, τις Vif, Vpr, Nef και με το RNA. Πρωτεολυτική κατεργασία των Gag και Pol σηματοδοτεί την εκβλάστηση (Viral Budding) των ώριμων ισωμάτων και την απομάκρυνση του ιού από το κύτταρο (Tritel and Resh 2001) (Εικ. 1.5.).



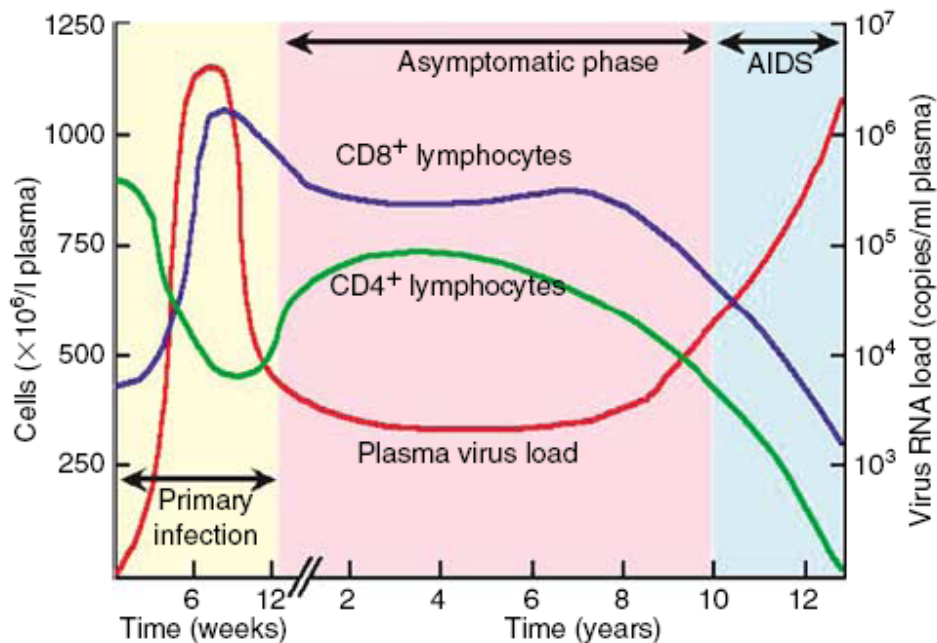
Εικ. 1.5. Βιολογικός κύκλος του ιού HIV

1.1.6 Παθογένεια του ιού

Το κύριο χαρακτηριστικό της μόλυνσης με τον HIV-1 είναι η ελάττωση του αριθμού των CD4 T λεμφοκυττάρων που οδηγεί σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και την εμφάνιση της νόσου του AIDS. Από την στιγμή της μόλυνσης μέχρι την εκδήλωση του AIDS η λοίμωξη με τον HIV παρουσιάζει τρεις χαρακτηριστικές φάσεις (Douek, Picker et al. 2003) (Εικ. 1.6). Η πρώτη φάση, γνωστή ως οξεία φάση (acute phase), ορίζεται από την στιγμή της μόλυνσης μέχρι την εμφάνιση αντισωμάτων κατά του ιού και διαρκεί μερικές εβδομάδες. Τα πρωταρχικά κλινικά συμπτώματα είναι όμοια με αυτά της λοιμώδους μονοπυρήνωσης και γι' αυτό τις περισσότερες φορές δεν γίνεται επιτυχής διάγνωση. Κατά την διάρκεια της οξείας φάσης, ο ιός πολλαπλασιάζεται διαρκώς απουσία οποιασδήποτε ειδικής αντι-ικικής ανοσοποιητικής απάντησης και δύναται να παραχθούν πάνω από 100 εκατομμύρια αντίγραφα ιικού RNA ανά ml. Παράλληλα, παρατηρείται ελάττωση στον αριθμό των CD4 T κυττάρων, με παράλληλη αύξηση του αριθμού των CD8 T κυττάρων που ακολουθούν την αύξηση του ιικού φορτίου (Cooper, Tindall et al. 1988; Kaufmann, Cunningham et al. 1998). Η δυσλειτουργία των HIV ειδικών CD4 T κυττάρων παρατηρείται πολύ νωρίς στην διάρκεια της οξείας φάσης και αυτό πιστεύεται ότι οφείλεται στην προτίμηση του ιού να μολύνει πρωταρχικά τα συγκεκριμένα κύτταρα (Altfeld, Rosenberg et al. 2001) (Douek, Brenchley et al. 2002). Στην συνέχεια ο αριθμός των CD4 T κυττάρων παρουσιάζει επανάκαμψη αλλά ο αριθμός δεν φτάνει ποτέ τα αρχικά επίπεδα ενώ ο αριθμός των CD8 T κυττάρων παραμένει ελαφρώς αυξημένος.

Μετά την οξεία φάση παρατηρείται μια ισορροπία ανάμεσα στον αριθμό των CD4 T λεμφοκυττάρων και του ιικού φορτίου που χαρακτηρίζει την ασυμπτωματική φάση. Η ασυμπτωματική φάση διαρκεί αρκετά χρόνια με κύριο χαρακτηριστικό την απουσία κλινικών συμπτωμάτων και με σταδιακή καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο χρόνος ημιζωής ενός ιοσωματίου είναι περίπου 30 λεπτά και ο συνολικός αριθμός ημερήσιας παραγωγής ιοσωμάτων σε έναν ασθενή με χρόνια μόλυνση φτάνει περίπου τα 10^{10} ιοσωμάτια (Ramratnam, Bonhoeffer et al. 1999; Simon and Ho 2003). Προς το τέλος της ασυμπτωματικής φάσης και εξαιτίας του μικρού αριθμού CD4 T

κυττάρων, οι φορείς παρουσιάζουν αρκετά κλινικά συμπτώματα που παρομοιάζουν αυτά μιας τυπικής ίωσης. Όταν ο αριθμός των CD4 T κυττάρων πέσει κάτω από το όριο των 200 κυττάρων ανά μικρόλιτρο τότε ο φορέας θεωρείται ότι έχει πλέον περάσει στο τρίτο στάδιο της μόλυνσης που είναι η εκδήλωση του AIDS.



Εικ. 1.6. Σχηματική αναπαράσταση της προόδου μιας τυπικής HIV μόλυνσης. Το σχεδιάγραμμα δείχνει τις αλλαγές στον αριθμό των CD4 και των CD8 T κυττάρων του περιφερικού αίματος και το ιικό φορτίο. (Munier, immunology and cell biology 2007, 85:6-15)

1.1.7 Ελάττωση του αριθμού των CD4 T κυττάρων

Παρόλο που οι κύριες αιτίες εκδήλωσης του AIDS έχουν καθοριστεί από τις πρώτες κιάλας μελέτες ως η ελάττωση του αριθμού των CD4 T κυττάρων και η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, επί του παρόντος δεν υπάρχει συγκεκριμένη θεωρία για τον ακριβή μηχανισμό αυτής της παθογένειας. Γενικά πιστεύεται ότι ο μειωμένος αριθμός των CD4 κυττάρων οφείλεται είτε στον κυτταρικό θάνατο των συγκεκριμένων κυττάρων είτε σε δυσλειτουργία του ομοιοστατικού μηχανισμού του οργανισμού που τον καθιστά ανίκανο να αναπληρώσει τα αποθανόντα κύτταρα.

A) Κυτταρικός θάνατος των CD4 T κυττάρων

Η αιτία της ελάττωσης των CD4 T κυττάρων αποτελεί ίσως τον μεγαλύτερο γρίφο που καλούνται να λύσουν οι υπάρχουσες ερευνητικές μελέτες αφού υπάρχει μεγάλη διαφωνία στην επιστημονική κοινότητα για τον ακριβή μηχανισμό θανάτωσης των κυττάρων. Οι μέχρι τώρα θεωρίες κατατάσσουν τα αίτια της ελάττωσης του αριθμού σε δύο διαφορετικούς μηχανισμούς που εμπλέκουν άμεση και έμμεση κυτταροπαθογένεια. Πρωταρχικές μελέτες πρότειναν ότι η ελάττωση των κυττάρων οφειλόταν στην κυτταροτοξικότητα, δηλαδή στην άμεση επίδραση της μόλυνσης των κυττάρων από τον ιό κυτταρόλυση λόγω της αυξημένης παραγωγής ισοματίων (Lifson, Reyes et al. 1986; Ferri, Jacotot et al. 2000). Επίσης σημαντικός αριθμός μολυσμένων κυττάρων υπόκειται την επίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος και καταστρέφονται. Με σχετικά πρόσφατες τεχνικές μετρήσεις ικού φορτίου και κυτταρικού θανάτου έγινε εμφανές ότι ο αριθμός των κυττάρων που πεθαίνουν εξαιτίας της παρουσίας του ιού είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των κυττάρων που είναι μολυσμένα από τον ιό. Ως εκ τούτου ήταν προφανές ότι η κυτταροτοξική θεωρία δεν μπορούσε να εξηγήσει επαρκώς των κυτταρικό θάνατο που παρατηρείτε στην ασυμπτωματική φάση.

Η εξήγηση της έμμεσης καταστροφή των CD4 T κυττάρων, χωρίς αυτά να έχουν προηγουμένως μολυνθεί από τον HIV, συγκαταλέγεται ως μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις σήμερα. Αρχικά είχε παρατηρηθεί ότι η καταστροφή των κυττάρων που δεν

έχουν μολυνθεί οφείλεται σε προγραμματισμένο θάνατο από απόπτωση. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την παθογένεια του ιού αλλά η εμπλοκή ιικών πρωτεϊνών που προκαλούν την απόπτωση των κυττάρων και ο επαγόμενος θάνατος από ενεργοποίηση είναι οι κυριότερες αιτίες απόπτωσης (Picker and Watkins 2005). Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελετάει έναν πιθανό μηχανισμό επαγωγής απόπτωσης μη μολυσμένων κυττάρων και ο προτεινόμενος μηχανισμός θα συζητηθεί στο κεφάλαιο 3.

B) Δυσλειτουργία ομοιοστατικού μηχανισμού

Εκτός από την αυξημένη καταστροφή των κυττάρων που παρατηρείται στην λοίμωξη με HIV, ένας επιπλέον σημαντικός παράγοντας είναι η ανικανότητα του οργανισμού να αναπληρώσει τα κύτταρα που χάνονται. Κύριο χαρακτηριστικό της απώλειας των κυττάρων είναι η ελάττωση του αριθμού των παρθενικών κυττάρων παρόλο που παρατηρείται αυξημένη απόπτωση και προτίμηση του ίου στο να μολύνει ενεργοποιημένα κύτταρα μνήμης CD4/CD45RO T κύτταρα (de Martini, Turner et al. 1988). Η εξήγηση αυτού του φαινομένου έγκειται στο γεγονός ότι εξαιτίας της χρόνιας ενεργοποίησης παρθενικά κύτταρα (CD4/CD45RA) ενεργοποιούνται και τροφοδοτούν τον πληθυσμό των ενεργοποιημένων CD4/CD45RO T κυττάρων τα οποία στην συνέχεια πεθαίνουν (Murray, Kaufmann et al. 1998).

Το σημαντικότερο όργανο παραγωγής παρθενικών κυττάρων είναι ο θύμος ενώ στους ενήλικες έχουν αναφερθεί και συμπληρωματικά εξωθυμικά κέντρα παραγωγής. Ο ιός HIV προκαλεί δυσλειτουργία του θύμου αλλά πόσο νωρίς κατά την διάρκεια της μόλυνσης επιτυγχάνεται αυτό είναι ακόμα υπό συζήτηση. Μερικές μελέτες έδειξαν φυσιολογική παραγωγή CD4 T κυττάρων κατά την διάρκεια των τριών πρώτων μηνών της μόλυνσης (Sempowski, Hicks et al. 2005). Άλλες, μελέτες έδειξαν δυσλειτουργία με μείωση του ενδοθυμικού πολλαπλασιασμού των T κυττάρων μέσα στον πρώτο χρόνο της μόλυνσης (Dion, Roulin et al. 2004). Παρόλα αυτά, γνωρίζοντας ότι ο θύμος χάνει την παραγωγικότητα του κατά την διάρκεια της εφηβείας, η συμβολή της δυσλειτουργίας του

θύμου στην ελάττωση του αριθμού των CD4 T κυττάρων πιστεύεται ότι είναι ελάχιστη (Wolthers, Schuitemaker et al. 1998; Hazenberg, Hamann et al. 2000).

Τα δευτερογενή λεμφικά όργανα, όπως οι λεμφαδένες, είναι συνυπεύθυνα για την αδυναμία του οργανισμού να αναπληρώσει τα κύτταρα που πεθαίνουν εξαιτίας της μόλυνσης. Κατά την ασυμπτωματική φάση, που χαρακτηρίζεται από χρόνια ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, έχει παρατηρηθεί ότι η δομή των λεμφαδένων διαταράσσεται (Pantaleo, Graziosi et al. 1994). Αυτό επιτυγχάνεται λόγω του ότι ιοσωμάτια παγιδεύονται στα θυλακοειδή δενδριτικά κύτταρα (follicular dendritic cells, FDC) τα οποία στην συνέχεια μολύνουν τα CD4 T κύτταρα που στρατολογούνται εκεί λόγω της χρόνιας ενεργοποίησης. Συνέπεια αυτού είναι η καταστροφή της δομής των λεμφαδένων που οδηγεί τελικά σε δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Schacker, Nguyen et al. 2002).

1.1.8 Δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος

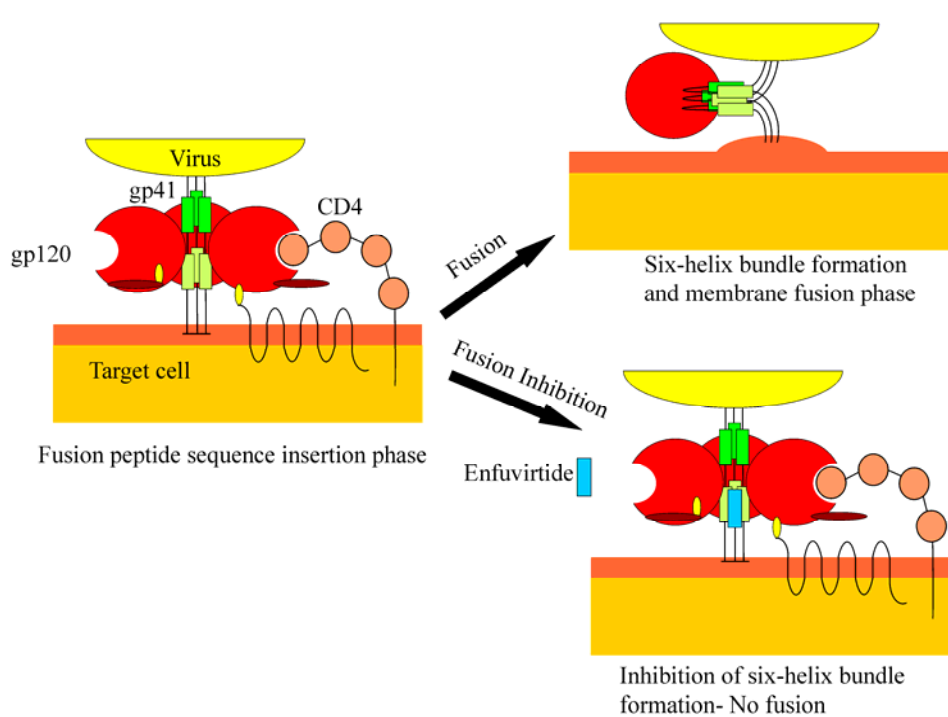
Έκτος από την ελάττωση του αριθμού των CD4 T κυττάρων και την ανικανότητα του οργανισμού να αναπληρώσει τα κύτταρα που πεθαίνουν, δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος οφείλεται και στην μειωμένη λειτουργικότητα των μολυσμένων με HIV T κυττάρων όσον αφορά την αναγνώριση αντιγόνων και την ανοσολογική απάντηση. Η μειωμένη λειτουργικότητα των CD4 T κυττάρων οφείλεται κυρίως στην μειωμένη έκφραση μορίων που σχετίζονται με την αντιγονοπαρουσίαση με αποτέλεσμα τα κύτταρα να αδυνατούν να αναγνωρίσουν επαρκώς τα αντίστοιχα αντιγόνα τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μείωση της έκφρασης του CD4 υποδοχέα στα κύτταρα που είναι μολυσμένα από τον ιό κυρίως λόγω της δράσης της Nef πρωτεΐνης (Fackler, Alcover et al. 2007). Τέλος, στα κύτταρα που δεν έχουν μολυνθεί από τον ιό, επιδρούν διάφορες πρωτεΐνες του ιού όπως η Tat και η gp120 και προκαλούν δυσλειτουργία των T κυττάρων με συνέπεια να χάνουν την ανοσοποιητική τους ικανότητα.

1.1.9 Αντιρετροϊκή θεραπεία της μόλυνσης HIV

Από την πρώτη απομόνωση του ιού μέχρι τις ημέρες μας πρωταρχικός στόχος στο πεδίο της έρευνας του HIV είναι η ανακάλυψη φαρμακευτικών σκευασμάτων που θα καταπολεμούν αποτελεσματικά την μόλυνση. Προς αυτήν την κατεύθυνση έχει παρατηρηθεί ικανοποιητική πρόοδος και περίπου πάνω από 20 αντί-HIV φάρμακα έχουν πάρει την έγκριση του Αμερικανικού οργανισμού φαρμάκων (FDA) (De Clercq 2004). Η πλειοψηφία αυτών των φαρμάκων σχετίζεται με την παρεμπόδιση της διαδικασίας αντιγραφής του ιού, γεγονός που υποδεικνύει ότι η μόλυνση του κυττάρου έχει ήδη επιτευχθεί. Μέχρι πρόσφατα, σκοπός λοιπόν των συγκεκριμένων φαρμάκων ήταν να παρεμποδίσουν ή να μειώσουν την περαιτέρω μολυσματικότητα του ιού. Τα αντιρετροϊκά φάρμακα κατηγοριοποιούνται ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους σε τρεις ομάδες : 1) νουκλεοσιδικόι αναστολείς την αντίστροφης μεταγραφάσης (nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTI), 2) μη νουκλεοσιδικόι αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTI) (Imamichi 2004; Zapor, Cozza et al. 2004) και 3) αναστολείς πρωτεασών (protease inhibitors PI) (Dunn, Goodenow et al. 2002). Τα τελευταία χρόνια τα φάρμακα χορηγούνται σε συνδυασμό για να υπάρχει πιο επιτυχημένη θεραπεία και ονομάζεται HAART (Highly active antiretroviral therapy). Παρόλο που η θνησιμότητα σε παγκόσμιο επίπεδο έχει μειωθεί σημαντικά, ο μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων του ιού έχει δημιουργήσει ανθεκτικά στελέχη τα οποία αντιστέκονται στην θεραπεία.

Η νέα γένια φαρμάκων καλείται να καταπολεμήσει την υψηλή τοξικότητα και την ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε στα πρώτα φαρμακευτικά σκευάσματα. Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί αποτελεσματική θεραπεία και τα υπάρχοντα φάρμακα απλώς αυξάνουν το προσδόκιμο ζωής των ασθενών. Η νέα τάση στον σχεδιασμό φαρμάκων έχει επικεντρωθεί κυρίως στην ανάπτυξη φαρμάκων που θα εμποδίζουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο. Οι αναστολείς της εισόδου του ιού πιστεύεται από πολλούς ότι είναι το επόμενο βήμα για την καταπολέμηση την ασθένειας αφού εκτός των άλλων δύναται να παρεμποδίσουν και την μετάδοση του ιού σε νέους φορείς (Stone 2002; Shattock and Moore 2003). Το πρώτο τέτοιο φάρμακο είναι το Enfuvirtide (T-20) το οποίο έχει πάρει την έγκριση του FDA και της Ευρωπαϊκής επιτροπής για την θεραπεία του AIDS. Είναι ένα

συνθετικό πεπτίδιο 36 αμινοξέων το οποίο εμποδίζει την είσοδο του ιού και πιο συγκεκριμένα παρεμποδίζει την σύντηξη του φάκελου του ιού με την μεμβράνη του κυττάρου στόχου, με το να προσδένεται στο υδροφοβικό επαναλαμβανόμενο επταπεπτίδιο (HR1) της gp41 (Εικ. 1.7).



Εικ. 1.7. Μηχανισμός αναστολής της εισόδου του ιού HIV-1 στα κύτταρα από το συνθετικό πεπτίδιο enfuvirtide.

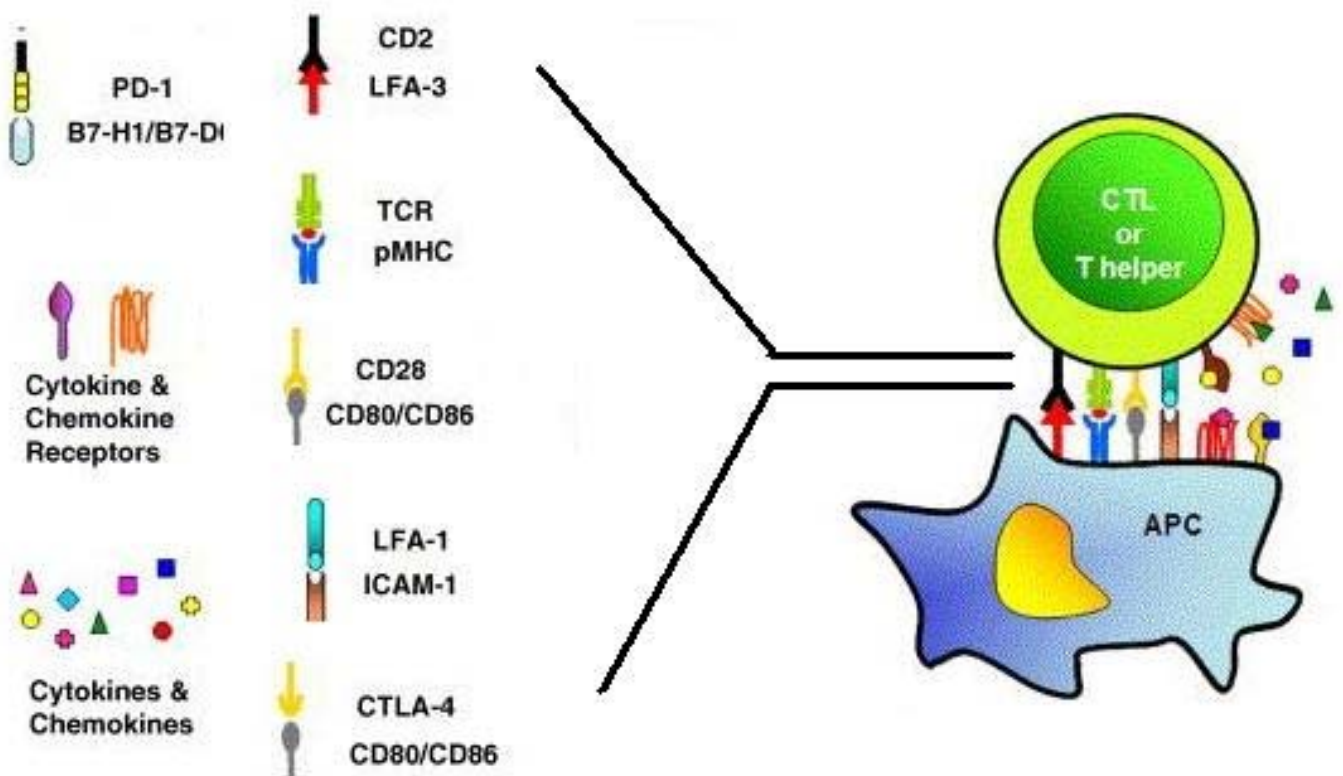
1.2 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ

1.2.1 Αντιγονοπαρουσίαση

Ο νόμος της φύσης επιτάσσει έναν συνεχή αγώνα για την επιβίωση του ισχυρότερου οργανισμού. Έτσι ο ανθρώπινος οργανισμός έχει εξελιχτεί και αναπτύζει τους απαραίτητους μηχανισμούς που του επιτρέπουν να αμύνεται επιτυχώς εναντίων των επιβλαβών οργανισμών. Η αναγνώριση παθογόνων οργανισμών και η ειδική ανοσιακή απάντηση εναντίον τους επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της διαδικασίας της αντιγονοπαρουσίασης. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει την παρουσίαση αντιγόνων, δηλαδή μικρών κυρίως πεπτιδίων που προέρχονται από τους μικροοργανισμούς και την ανάδειξη τους στο μέγιστο σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας (MHC). Υπάρχουν δύο διαφορετικές τάξεις μορίων, γνωστές ως MHC τάξης I και MHC τάξης II, με αρκετές ομοιότητες στην γενική τους δομή αλλά διαφορετικό μηχανισμό παρουσίασης αντιγόνου. Τα MHC τάξης I προσδένονται σε πεπτίδια τα οποία προέρχονται από κατακερματισμό πρωτεϊνών που συντέθηκαν μέσα στα κύτταρα ενώ τα MHC τάξης II προσδένονται σε πεπτίδια από τον κατακερματισμό εξωκυττάρων πρωτεϊνών που έχουν εγκλωπωθεί από τα κύτταρα με ενδοκύτωση (Madden 1995). Μεταφορά του συμπλόκου μαζί με το αντιγόνο στην επιφάνεια των κυττάρων είναι το πρώτο βήμα για την παρουσίαση του αντιγόνου η οποία πραγματοποιείται κυρίως από κύτταρα ειδικευμένα για αυτήν την λειτουργία (antigen presenting cells, APC), όπως τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα Β κύτταρα. Τα αντιγόνα αναγνωρίζονται από τα Τ κύτταρα, μέσω του Τ υποδοχέα (TCR), τα οποία στην συνέχεια ρυθμίζουν την ειδική ανοσιακή απάντηση εναντίον του συγκεκριμένου παθογόνου.

Η αρχική πρόσδεση των Τ κυττάρων με τα APC επιτυγχάνεται με μη ειδικές προσδέσεις μεταξύ υποδοχέων που βρίσκονται στην επιφάνεια των APC, όπως τα ICAM-1 (CD54) και ICAM-3 (CD50), και υποδοχέων στην επιφάνεια των Τ κυττάρων, όπως η ιντεγκρίνη και το LFA-1 (lymphocyte functional antigen-1). Με αυτόν τον τρόπο τα Τ κύτταρα ανιχνεύουν όλη την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης και όταν αναγνωρίσουν κάποιο αντιγόνο/MHC σύμπλοκο τότε πραγματοποιείται αλλαγή στην χωροδιάταξη του LFA-1 υποδοχέα η οποία έχει ως αποτέλεσμα την ισχυρότερη πρόσδεση

με τον ICAM-1 και την παρατεταμένη αλληλεπίδραση των T κυττάρων με τα APC. Η πρόσδεση του TCR με το μέγιστο σύμπλοκο ιστοσυμβατότητας ακολουθεί την πρόσδεση του CD4, στα CD4 T κύτταρα, ή του CD8, στα CD8 T κύτταρα, με το αντίστοιχο MHC μόριο. Τα CD4 T κύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα προσδεδεμένα στο MHC τάξης II ενώ τα CD8 T κύτταρα στο MHC τάξης I. Αποτέλεσμα της πρόσδεσης είναι η έναρξη μονοπατιών τα οποία όμως δεν είναι αρκετά για να ενεργοποιήσουν πλήρως τα κύτταρα και είναι απαραίτητη ύπαρξη ενός δεύτερου διεγερτικού σήματος (Shaw and Dustin 1997).

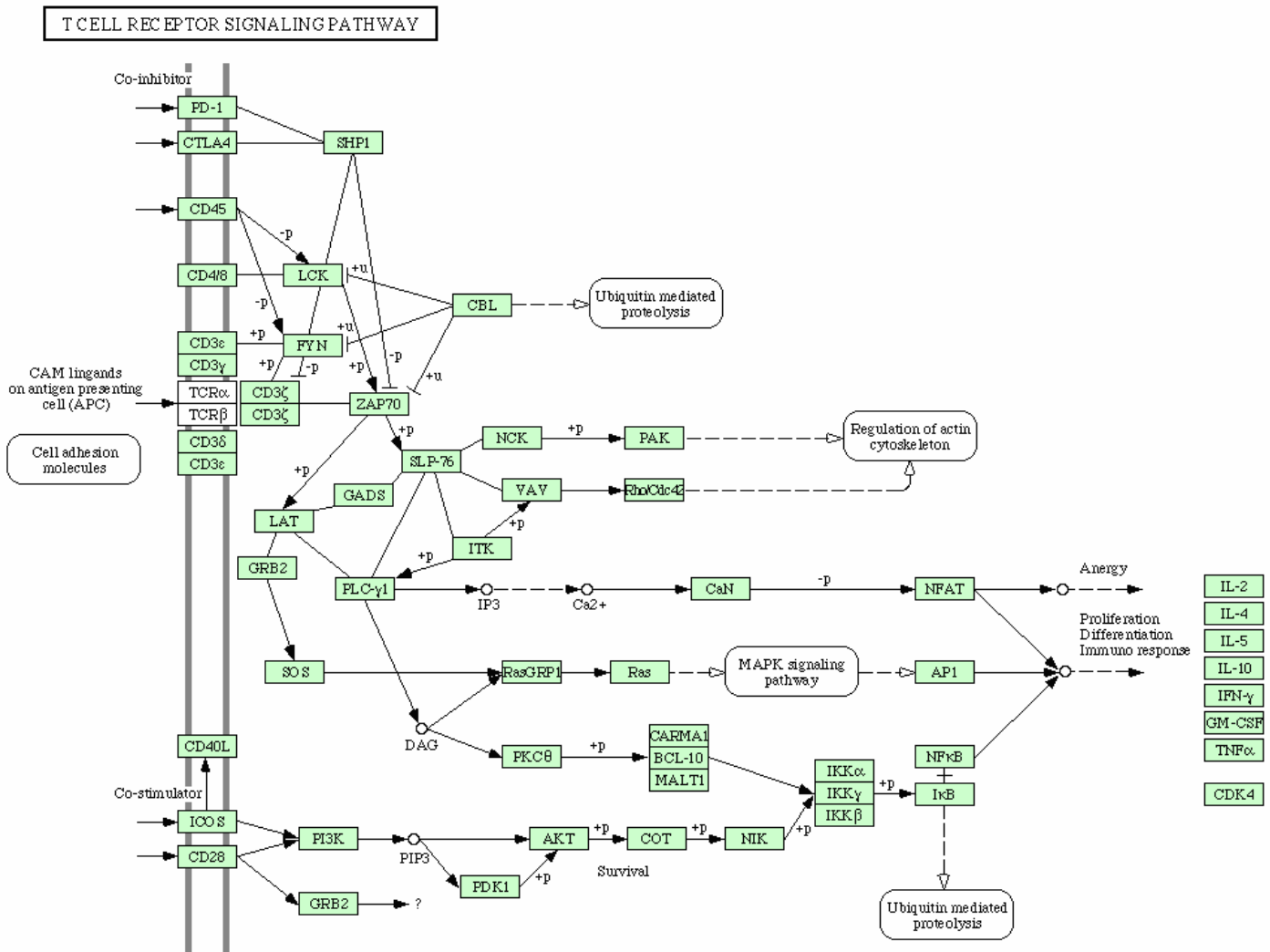


Εικ. 1.8. Ανοσολογική σύναψη (immune synapse) μεταξύ αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου και T κυττάρου. (αρχικό σχήμα από το οποίο μετασχηματίστηκε το

παραπάνω σχεδιάγραμμα από Ginzalez et al. Cytokine and cytokine growth factors. 2007;18:19-31)

Το συνδιεγερτικό σήμα προέρχεται από υποδοχείς οι οποίοι κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης βρίσκονται σε κοντινή απόσταση από το TCR δημιουργώντας μια ανοσολογική σύναψη (immune synapse, IS). Το CD28 και το CTLA-4 (CD152) είναι οι κυριότεροι συνδιεγέρτες στην επιφάνεια των T κυττάρων και αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα B7-1 (CD80) και B7-2 (CD86) στην επιφάνεια των APC (Viola and Lanzavecchia 1996). Το CD28 είναι ο κύριος συνδιεγέρτης στα παρθενικά κύτταρα και η λειτουργία του έχει συσχετηθεί με παρατεταμένη και αυξημένη παραγωγή κυτοκινών από τα κύτταρα. Αντιθέτως το CTLA-4 παρουσιάζει ανασταλτική δράση της ενεργοποίησης του κυττάρου με μειωμένη παραγωγή κυτοκινών (Gonzalez, Carreno et al. 2007). Γενικά πιστεύεται ότι η σταθερή έκφραση του CD28 στα παρθενικά κύτταρα ευνοεί την ενεργοποίηση των κυττάρων τα οποία μετά από την κορύφωση της ενεργοποίησης αυξάνουν την έκφραση του CTLA-4 που οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησης.

Ο αριθμός των μορίων που εμπλέκονται σε μία ανοσολογική σύναψη συνεχώς αυξάνεται και η λειτουργική σημασία του κάθε μορίου είναι ακόμα υπό μελέτη (Εικ. 1.8). Έτσι υποδοχείς στην επιφάνεια των T κυττάρων όπως το CD45RO, το CD2 και το CD3 έχουν εμπλακεί στην σηματοδότηση του κυττάρου ενώ άλλοι υποδοχείς, όπως οι υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4, εμπλέκονται στην σταθεροποίηση της σύνδεσης μεταξύ των κυττάρων.



Εικ. 1.9. Ενδοκυτταρικά σήματα που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των T κυττάρων κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης. (KEGG PATHWAY database, <http://www.genome.jp/kegg/regulation.html>)

Η αναγνώριση του συμπλόκου αντιγόνο/MHC από τον TCR υποδοχέα και η στρατολόγηση των διαφόρων υποδοχέων στην ανοσολογική σύναψη έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία συμπλεγμάτων (clustering) των υποδοχέων με συνέπεια την έναρξη του σήματος ενεργοποίησης (Εικ 1.9). Το σύμπλεγμα των υποδοχέων προκαλεί ενεργοποίηση κινάσων τυροσίνης από την δράση των Src κινάσων, Lck και Fyn, την

Zap70 και μέλη της οικογένειας των Tec κινασών (Chu, Morita et al. 1998) (Schaeffer, Debnath et al. 1999). Αυτό το πρώτο κύμα φωσφορυλίωσης προκαλεί περαιτέρω ενδοκυτταρικά σήματα που οδηγούν στην αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB και της MAPK (Ras-mitogen-activated protein) πρωτεΐνης (van Leeuwen and Samelson 1999). Αυτοί οι καταρράκτες μονοπατιών οδηγούν στην ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι NFAT (nuclear factor of activated T cells), το AP1 (activator protein 1) και οι Rel πρωτεΐνες, οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό, στην διαφοροποίηση και την απόπτωση των T κυττάρων (Rao, Luo et al. 1997) (Kuo and Leiden 1999).

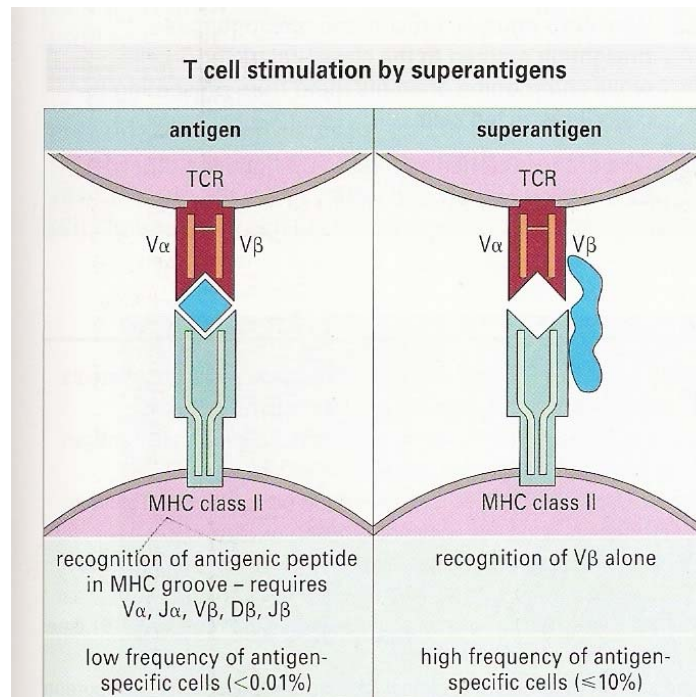
1.2.2 Εντεροτοξίνη A

Η εντεροτοξίνη A (SEA) ανήκει σε μία μεγάλη οικογένεια εντεροτοξινών που παράγονται από τον σταφυλόκοκκο *S. Aureus* και θεωρούνται υπεύθυνες για ένα μεγάλο αριθμό αλλεργικών αντιδράσεων και τροφικών δηλητηριάσεων (Johnson, Russell et al. 1991) (Balaban and Rasooly 2000). Ειδικά οι τροφικές δηλητηριάσεις που προκαλούνται από τον σταφυλόκοκκο αποτελούν το δεύτερο πιο κοινό αίτιο τροφικής δηλητηρίασης στις Ηνωμένες πολιτείες και η εντεροτοξίνη A είναι υπεύθυνη για την πλειοψηφία αυτών των κρουσμάτων (Levine, Smart et al. 1991) (Bunning, Lindsay et al. 1997). Ακόμα και μικρές ποσότητες SEA είναι αρκετές για να προκαλέσουν δηλητηρίαση αφού σε μία επιδημία στις ΗΠΑ ο μέσος όρος ποσότητας που εντοπίστηκε στο γάλα ήταν μόνο 0.5 ng/ml (Evenson, Hinds et al. 1988). Η εντεροτοξίνη είναι πολύ δύσκολο να καταστραφεί επειδή έχει σχετικά μικρό μέγεθος, είναι ανθεκτική σε απενεργοποίηση από πρωτεάσες του γαστρεντερικού συστήματος και είναι πολύ ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες (Denny, Humber et al. 1971; Hernandez, Goyache et al. 1993).

Η βιολογική δράση των εντεροτοξινών, οι οποίες συχνά αναφέρονται και ως υπερ-αντιγόνα, έγκειται στην ιδιότητα τους να ενεργοποιούν μη ειδικά τον πολλαπλασιασμό των CD8 και CD4 T λεμφοκυττάρων με έναν εναλλακτικό μηχανισμό

αντιγονοπαρουσίασης(White, Herman et al. 1989). Εν αντίθεσει με τα συμβατικά αντιγόνα, οι εντεροτοξίνες προσδένονται σαν άθικτα μόρια στο τάξης II μόριο του κυρίου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας εξωτερικά της αύλακας που βρίσκεται το αντιγόνο, και στην μεταβλητή Vβ περιοχή της β αλυσίδας του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR) (Εικ. 1.10.). Στο ανθρώπινο ρεπερτόριο των T κυττάρων υπάρχουν περίπου 24 Vβ περιοχές του T υποδοχέα και εφόσον η SEA μπορεί να προσδεθεί σε παραπάνω από μία Vβ περιοχή τότε δύναται να ενεργοποιήσει μέχρι και το 25% των T λεμφοκυττάρων (Champagne, Hucheng et al. 1993) (Hudson, Robinson et al. 1993) (Li, Llera et al. 1999). Η αλληλεπίδραση αυτή φέρνει πιο κοντά τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) με τα T λεμφοκύτταρα και το σήμα της ενεργοποίησης αυξάνεται με την αλληλεπίδραση των συνδιεγερτικών μορίων που απαντούνται και στην συμβατική αντιγονοπαρουσίαση. Συνεπακόλουθα, η έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF), ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και η ιντερλευκίνη 2 (IL-2), οδηγούν το ανοσοποιητικό σύστημα προς μία Th1 ανοσιακή απάντηση που προκαλεί έντονη ενεργοποίηση των T κυττάρων ακολουθούμενη από απόπτωση(Norrby-Teglund, Norgren et al. 1994) (Wang, Zhu et al. 1997) (Gorak-Stolinska, Kemeny et al. 2002).

Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν διακριτές διαφορές στα ενδοκυτταρικά σήματα που διέπουν το κλασσικό μοντέλο αντιγονοπαρουσίασης και το εναλλακτικό που χρησιμοποιούν τα υπερ-αντιγόνα. Καταρχάς τα υπερ-αντιγόνα δεν προκαλούν αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου και μπορούν να ενεργοποιήσουν την p56^{lck} (Liu, Lampe et al. 1991) (Yamasaki, Tachibana et al. 1997). Επίσης, υπάρχουν αρκετά ερωτηματικά όσον αφορά τον βαθμό στον οποίο τα υπερ-αντιγόνα χρησιμοποιούν τα συνδιεγερτικά μόρια B7/CD28 ενώ άλλες μελέτες υπέδειξαν την εμπλοκή του STAT3 και όχι του STAT5 στην ενεργοποίηση των CD4 T λεμφοκυττάρων (Gerwien, Nielsen et al. 1999).



Εικ. 1.10. Διαφορές μεταξύ κλασσικής αντιγονοπαρουσίασης και της εναλλακτικής αντιγονοπαρουσίασης από τα υπερ-αντιγόνα. (σχήμα από: Immunology. Roitt. 6th edition)

1.2.3 Απόπτωση κυττάρων

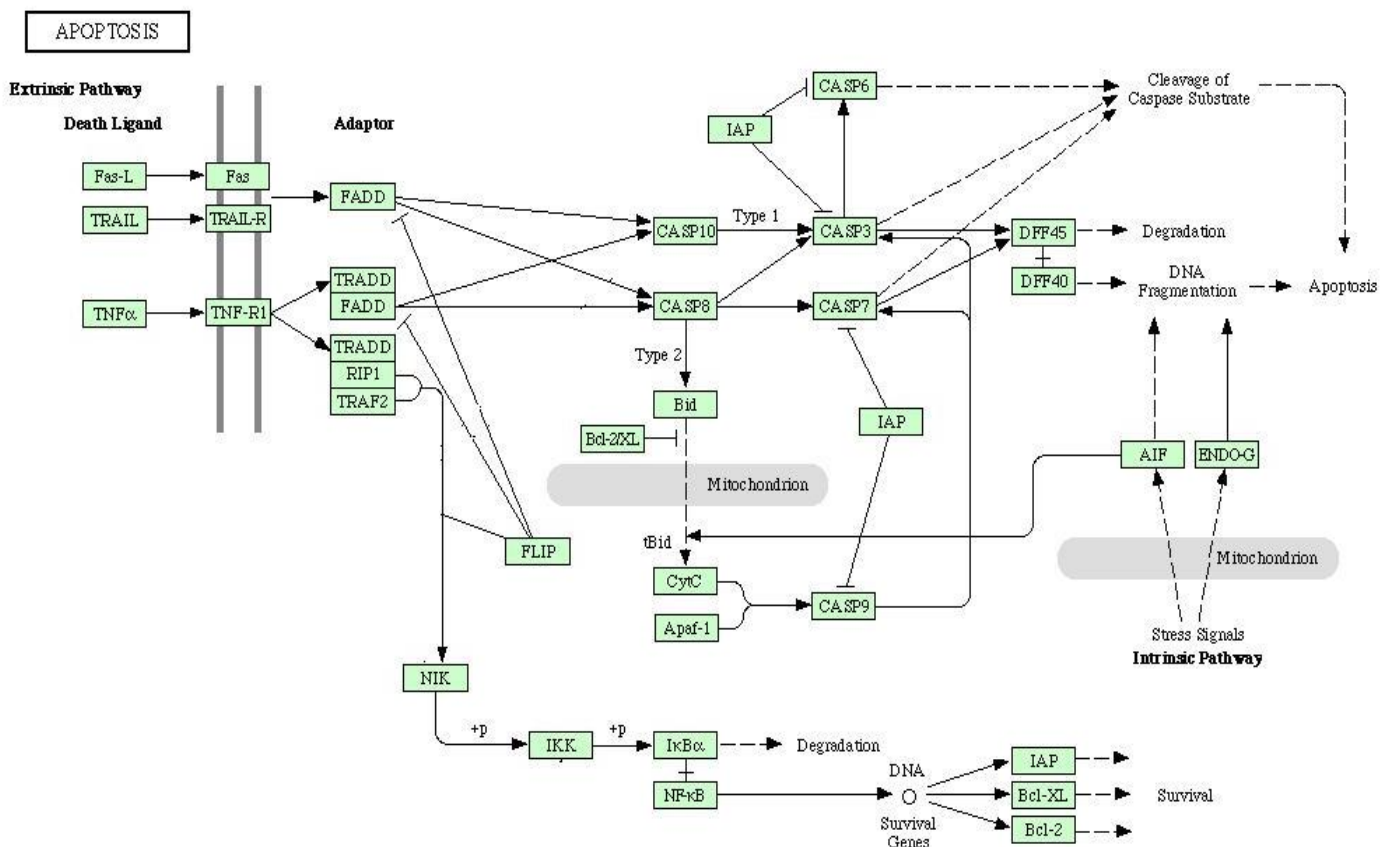
Ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να επέλθει είτε με νέκρωση των κυττάρων είτε με απόπτωση. Η νέκρωση προκαλείται από εξωτερικά ερεθίσματα που εξαναγκάζουν το κύτταρο σε ξαφνικό θάνατο χωρίς συνήθως να ενεργοποιείται συγκεκριμένο μονοπάτι και είναι μη αναστρέψιμος. Αντιθέτως, η απόπτωση θεωρείται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος όπου το κύτταρο ενεργοποιεί εσωτερικούς μηχανισμούς που οδηγούν σε οργανωμένο θάνατο. Ο θάνατος αυτός αφορά κυρίως κύτταρα τα οποία πρέπει να αναπληρώνονται συνεχώς όπως τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Δυσλειτουργίες στον μηχανισμό της απόπτωσης είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση ορισμένων μορφών καρκίνου, την ανάπτυξη αυτοάνοσων και νευροεκφυλιστικών

ασθενειών καθώς και πολλά σύνδρομα ανοσοανεπάρκειας (Steller 1995; Arch and Thompson 1999). Μορφολογικά η απόπτωση διαφέρει από την νέκρωση αφού παρατηρείται συμπύκνωση και αποδόμηση του DNA, συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα, χωρίς διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης (Vermees, Haanen et al. 2000) ενώ στην νέκρωση παρατηρείται διόγκωση του κυττάρου που οδηγεί σε διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης και λύση του κυττάρου. Βιοχημικά η απόπτωση χαρακτηρίζεται από μείωση του ενδοκυτταρικού pH, ενεργοποίηση μελών της οικογένειας κασπασών και παραγωγή ceramide (Budihardjo, Oliver et al. 1999).

Οι μηχανισμοί ενεργοποίησης της απόπτωσης περιλαμβάνουν μια σειρά από μονοπάτια που οδηγούν στον κατακερματισμό του DNA και τελικά τον κυτταρικό θάνατο. Λειτουργικά οι μηχανισμοί απόπτωσης μπορούν να διαχωριστούν σε αυτούς που ενεργοποιούν μέλη της οικογένειας κασπασών και σε αυτούς που είναι ανεξάρτητοι της ενεργοποίησης των κασπασών (Nicholson 1999; Mootha, Wei et al. 2001). Ο δεύτερος μηχανισμός στηρίζεται σε μεταβολές της μιτοχονδριακής υπόστασης που προκαλεί μείωση της παραγωγής ATP και τελικά κυτταρικό θάνατο. Παρόλα αυτά ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν απαντάται συχνά και επικρατέστερος τρόπος προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου είναι μέσω της ενεργοποίησης των κασπασών. Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης οι οποίες βρίσκονται φυσιολογικά στο κυτταρόπλασμα ως ανενεργές προκασπάσες και η ενεργοποίησή τους επιτυγχάνεται ύστερα από πρωτεολυτική δράση των ιδίων ή άλλων πρωτεασών (Mehmet 2000). Λειτουργικά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: της εναρκτήριες, όπως οι κασπάσες 2, 8 και 9, και οι εκτελεστικές όπως οι 3, 6, και 7 (Green and Kroemer 1998).

Τα μονοπάτια που ενεργοποιούν τις κασπάσες μπορούν να διαχωριστούν σε αυτά που ξεκινούν από εξωτερικά σήματα μέσω κυτταρικών υποδοχέων (εξωτερικό μονοπάτι) και σε αυτά που ξεκινούν από εσωτερικές μεταβολές (εσωτερικό μονοπάτι). Στο εξωτερικό μονοπάτι έχουν αναγνωριστεί 6 κύριοι υποδοχείς θανάτου (Death Receptors): ο FAS (CD95), ο TNFR1 (tumour necrosis factor receptor), ο DR3 (APO-3), TRAIL-R1 (APO-2, DR4), TRAIL-R2 (DR5) και ο DR6, που έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό ενδοκυτταρικά αμινοξικά μοτίβα θανάτου (Death Domains, DD) (Ashkenazi and Dixit 1998; Schulze-Osthoff, Ferrari et al. 1998). Όταν οι υποδοχείς προσδένονται στο φυσιολογικό τους δεσμευτή, σχηματίζουν τριμερή σύμπλοκα τα οποία προκαλούν την

στρατολόγηση της πρωτεΐνης Fas associated death domain (FADD) (Siegel, Frederiksen et al. 2000) (Chan, Chun et al. 2000) (Chinnaiyan, O'Rourke et al. 1995). Η FADD αποτελείται από δύο λειτουργικά μέρη: το death domain (DD) και το death effector domain (DED). Το υπάρχον μοντέλο προϋποθέτει την πρόσδεση του FADD, είτε απευθείας είτε με την μεσολάβηση ενός άλλου μορίου (TRADD), στους υποδοχείς θανάτου μέσω των death domains των δύο μορίων και την πρόσδεση με την προκασπάση-8 μέσω του death effector domain. Η πρόσδεση της προκασπάσης-8 στο FADD οδηγεί στην αυτό-πρωτεολυτική κατεργασία που οδηγεί στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8 η οποία στην συνέχεια ξεκινάει ένα μονοπάτι ενεργοποίησης κασπασών που προκαλούν τον κυτταρικό θάνατο (Εικ. 1.11)(Salvesen and Dixit 1999).



Εικ. 1.11. Απεικόνιση των εσωτερικών (intrinsic) και εξωτερικών (extrinsic) αποπτωτικών μονοπατιών. (KEGG PATHWAY database, <http://www.genome.jp/kegg/regulation.html>)

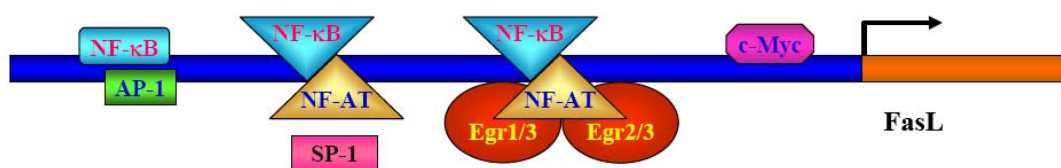
Το εσωτερικό μονοπάτι ενεργοποίησης της απόπτωσης δεν ξεκινά από εξωτερικά σήματα αλλά βασίζεται σε διαταραχές της μιτοχονδριακής λειτουργίας. Σε συνθήκες έντονου στρες πραγματοποιείται απελευθέρωση μιτοχονδριακών πρωτεϊνών, κυρίως του κυτοχρώματος c, στο κυτταρόπλασμα. Η απελευθέρωση πραγματοποιείται μόνο όταν προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες της οικογένειας Bcl-2, όπως η Bax και η Bak, προσδένονται και απενεργοποιούν αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας (Huang and Strasser 2000) (Cory and Adams 2002). Το κυτόχρωμα c όταν βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη APAF-1, την προκασπάση-9 και μόρια ATP, δημιουργώντας ένα αποπτωτικό σύμπλοκο (Li, Nijhawan et al. 1997). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πρωτεολυτική κατεργασία της προκασπάσης-9, και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση της κασπάσης-9, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την κασπάση-3 προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο του κυττάρου.

1.2.4 Κυτταρικός θάνατος επαγόμενος από ενεργοποίηση

Στα T λεμφοκύτταρα έχει παρατηρηθεί ένας ιδιόμορφος μηχανισμός επαγωγής της απόπτωσης που προκαλείται από το διεγερτικό σήμα του TCR και ονομάζεται κυτταρικός θάνατος επαγόμενος από ενεργοποίηση (activation induced cell death, AICD). Αυτή η διαδικασία θεωρείται πολύ σημαντική για την ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης και την αποφυγή υπερβολικής ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος (Freitas and Rocha 1999). Η ευαισθησία των κυττάρων στον AICD εξαρτάται από το πόσο δυνατό είναι το σήμα ενεργοποίησης και το στάδιο ενεργοποίησης των κυττάρων. Έτσι κύτταρα που έχουν μόλις αναγνωρίσει κάποιο αντιγόνο είναι πιο ανθεκτικά ενώ κύτταρα που έχουν δεχθεί ήδη ένα σήμα ενεργοποίησης είναι πιο ευαίσθητα στον κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση.

Η απόπτωση των κυττάρων επάγεται κυρίως από τον υποδοχέα Fas ενώ και άλλοι μηχανισμοί, όπως μέσω του TNF-R και της perforine/granzyme, έχουν προταθεί ως εναλλακτικοί επαγωγείς της απόπτωσης (Dhein, Walczak et al. 1995; Zheng, Fisher et al.

1995). Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα έχουν αυξημένη έκφραση τόσο του υποδοχέα Fas όσο και του δεσμευτή του FasL (Fas ligand) και επομένως είναι ευαίσθητα σε απόπτωση είτε από μόνα τους (μέσω του δικού τους FasL) είτε από αλληλεπίδραση με άλλα κύτταρα. Η αυξημένη έκφραση τόσο του υποδοχέα όσο και του δεσμευτή είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης από τον TCR. Η έκφραση τους ρυθμίζεται από μεταγραφικούς παράγοντες που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των T κυττάρων κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης, όπως ο Egr (early growth response genes), NFAT (nuclear factor of activated T cells), NF-κB (nuclear factor kappa B), c-Myc, AP-1 (activator protein-1) και IRFs (interferon regulatory factors) (Εικ. 1.12). Πιο συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός παράγοντας NFAT ενεργοποιείται από την διέγερση του TCR και είναι σημαντικός ρυθμιστής της έκφρασης του FasL, της ιντερλευκίνης-2 και άλλων κυτοκινών σημαντικών για την ενεργοποίηση του T κυττάρου. Αναστολή της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα με κυκλοσπορίνη A (CsA) εμπόδιζε την έκφραση του FasL (Latinis, Norian et al. 1997) (Holtz-Heppelmann, Algeciras et al. 1998). Συνεπώς, όταν ένα T κύτταρο αναγνωρίσει ένα αντιγόνο εκτός από το σήμα ενεργοποίησης που δέχεται, γίνεται ταυτόχρονα ευαίσθητο σε αποπτωτικά σήματα εφόσον οι μεταγραφικοί παράγοντες που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του κυττάρου ρυθμίζουν ταυτόχρονα και την έκφραση αποπτωτικών μορίων.



Εικ. 1.12. Θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των T κυττάρων πάνω στον υποκινητή (promoter) του FasL γονιδίου.

1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Είκοσι έξη χρόνια έχουν περάσει από την αναγνώριση του συνδρόμου της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας και το AIDS συνεχίζει να αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα δημόσιας υγείας παγκοσμίως. Ο ιός HIV, ο αιτιολογικός παράγοντας για το AIDS, προκαλεί σταδιακή μείωση των CD4 T λεμφοκυττάρων που οδηγεί στην δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και καθιστά τον ασθενή ευάλωτο σε ευκαιριακές μολύνσεις και ογκογένεση. Η υπάρχουσα αντιρετροϊκή θεραπεία έχει μειώσει σημαντικά την θνησιμότητα σε παγκόσμιο επίπεδο αλλά η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών του ιού και η υψηλή τοξικότητα αποτελούν σημαντικά εμπόδια για την επιτυχημένη καταπολέμηση της μόλυνσης. Για τον σχεδιασμό καινούργιων αποτελεσματικών φαρμακευτικών σκευασμάτων είναι απαραίτητη η καλύτερη κατανόηση της παθογένεσης του ιού HIV και η συσχέτιση της με το AIDS.

Κατά την ασυμπτωματική φάση ο πληθυσμός των CD4 T κυττάρων ελαττώνεται αργά αλλά σταθερά το οποίο τελικά οδηγεί σε ανοσεπάρκεια και τελικά το AIDS. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείτε επιλεκτική απώλεια των μη μολυσμένων CD4/CD45RO T κυττάρων αλλά ο ακριβής μηχανισμός είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Διάφοροι ιικοί παράγοντες έχουν προταθεί να επάγουν την απόπτωση των κυττάρων όπως η πρωτεΐνη Tat και η Nef. Πρόσφατες μελέτες έχουν εστιαστεί στην τρίτη μεταβλητή (V3) περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης gp120 η οποία συμμετέχει στην αλληλεπίδραση του ιού με τους συνυποδοχείς.

Εφόσον ο πρωταρχικός στόχος του HIV είναι τα ενεργοποιημένα/αναμνηστικά CD4/CD45RO T κύτταρα και κύρια λειτουργία αυτών των κυττάρων είναι αλληλεπίδραση τους με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα μελετήσαμε την παθογένεια του HIV από μια καθαρά ανοσολογική σκοπιά. Προγενέστερες μελέτες της ερευνητικής μας ομάδας χρησιμοποίησαν ένα συνθετικό πολυπεπτίδιο 15 αμινοξέων από την τρίτη μεταβλητή περιοχή της γλυκοπρωτεΐνης gp120 το οποίο ενσωματώθηκε στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με την βοήθεια λιποσωμάτων. Στο εσωτερικό των λιποσωμάτων ήταν εγκλεισμένη η τοξίνη του τετάνου έτσι ώστε να εισέρθει στο εσωτερικό των κυττάρων και να παρουσιαστεί στην συνέχεια στην επιφάνεια τους προσδεμένο με ένα τάξης II MHC μόριο. Χρησιμοποιώντας αυτό το μοντέλο έδειξαν ότι

το V3 πεπτίδιο όταν βρίσκονται στην επιφάνεια των APC, κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης του τετάνου, προκαλεί ενισχυμένο πολλαπλασιασμό των απαντούντων CD4 T κυττάρων ακολουθούμενο από αυξημένη απόπτωση (Zafiroopoulos, Baritaki et al. 2001) (Zafiroopoulos, Baritaki et al. 2001) (Baritaki, Zafiroopoulos et al. 2002).

Κεντρικός στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν να εντοπιστούν τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια που μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο V3 φαινόμενο. Επειδή οι μέχρι τώρα μελέτες χρησιμοποιούσαν τον τοξοειδές του τετάνου σαν ειδικό αντιγόνο που ενεργοποιούσε μικρό αριθμό CD4 T κυττάρων έπρεπε να αντικατασταθεί από ένα πιο γενικευμένο σήμα. Το πρώτο μέρος της μελέτης ήταν να αντικατασταθεί το τετανοειδικό μοντέλο από το SEA και να αποδειχθεί ότι διατηρείται το φαινόμενο του V3. το δεύτερο μέρος της μελέτης ήταν να παρατηρήσουμε τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια που οδηγούν στην έντονη ενεργοποίηση των κυττάρων και την απόπτωση τους.

Τα βασικά ερωτήματα που τέθηκαν είναι:

- Αν διατηρείτε το V3 φαινόμενο κατά την αντιγονοπαρουσίαση ανεξαρτήτως του τετανοειδικού σήματος και χαρακτηρισμός του καινούργιου *in vitro* συστήματος.
- Εκτενέστερη μελέτη της αλληλεπίδρασης του συνθετικού πεπτιδίου με πρωτόγεννη T κύτταρα και διερεύνηση της αλληλεπίδρασης με του υποδοχείς χημειοκινών.
- Αναστολή του φαινομένου με συνθετικά πεπτίδια και ουσίες με θετικά και αρνητικά φορτία.
- Ποια είναι η επίδραση του πεπτιδίου στους φαινοτυπικούς υποτύπους των T κυττάρων
- Την έναρξη και ρύθμιση της μεταβίβασης ενδοκυτταρικών σημάτων τα οποία οδηγούν στην ενεργοποίηση-απόπτωση των CD4⁺ T-λεμφοκυττάρων.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Κυτταρικό υλικό

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα πρωτογενή περιφερικά μονοπύρηννα κύτταρα (PBMC) τα οποία απομονώθηκαν από Buffy coats, HIV-1 και CMV όρο-αρνητικών δοτών που παραχωρήθηκαν από το τμήμα αιμοδοσίας του Βενιζελείου Νοσοκομείου (Ηράκλειο Κρήτης). Επίσης στα πειράματα για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων με τους υποδοχείς χημειοκινών χρησιμοποιήθηκαν επιθηλιακά κύτταρα της κυτταρικής σειράς U87 τα οποία ήταν ευγενική προσφορά των Dr Littman, Dr HongKui Deng και του Centralised Facility for AIDS Reagents. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θερμοκρασία 37 °C και σε ατμόσφαιρα 5% CO₂.

2.1.1 Θρεπτικά Υλικά

1. Για τα PBMC

- Θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Gibco), εμπλουτισμένο με τα παρακάτω συμπληρώματα:
 - ✓ 5 % ανθρώπινο ορό ομάδας AB [human AB serum, HS]
 - ✓ 50 µg/ml gentamycin (Sigma)
 - ✓ 1x Non essential amino acids (Gibco)
 - ✓ 1x Sodium pyruvate (Gibco)
 - ✓ 2mM L-glutamine (Sigma)
- Διάλυμα διαχωρισμού PBMC σε διαβάθμιση πυκνότητας φικόλης (Ficol Paque, Pharmacia Biotech, Uppsalla, Sweden)
- Διάλυμα 1x PBS (Phosphate Buffered Solution): NaCl 9 gr/L, KH₂PO₄ 0,21 gr/L, Na₂HPO₄-7H₂O 0.72 gr/L, pH 7.3

2. Για τα επιθηλιακά U87

- Θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)
 - 15% Heat inactivated Foetal calf serum (FBS)
 - 300 µg/ml Geneticin (G418)
 - 1 µg/ml Puromycin (μόνο στις κυτταρικές σειρές διαμολυσμένες με τους υποδοχείς χημειοκινών)

- Dymethy Sulfoxide (DMSO)

Όλα τα τεχνητά υλικά και αντιδραστήρια για τις κυτταροκαλλιέργειες αποστειρώθηκαν είτε με θέρμανση στους 125 °C είτε με χρήση φίλτρων 0,2µm.

2.2 Πεπτίδια

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά πεπτίδια της τρίτης μεταβλητής περιοχής (V3) της γλυκοπρωτεΐνης gp120 από στο στέλεχος LAI του ιού HIV-1. Το 15-μερές συνθετικό πεπτίδιο του V3 διαθέτει 5 θετικά φορτισμένα αμινοξέα, ενώ συντέθηκαν παραλλαγές του πεπτιδίου με 1 (V3₊₁) και 9 (V3₊₉) θετικά φορτισμένα αμινοξέα (Πιν. 2.1). Για την μελέτη της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων με τους υποδοχείς χημειοκινών συντέθηκε 20-μερές συνθετικό πεπτίδιο της πρωτεΐνης MUC1(Πιν. 2.1). Τα πεπτίδια συντέθηκαν χρησιμοποιώντας την στρατηγική της επαναληπτικής συμπύκνωσης προστατευμένων πεπτιδίων (Fmoc/tBu chemistry) στον αυτόματο 430A Peptide Synthesizer (Applied Biosystems) (Krambovitis, Hatzidakis et al. 1998). Τα φθορίζοντα πεπτίδια παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας fluorescein-O succinimide (FLUOS) σε στερεή φάση (solid phase) επιλεκτική για την αμινοτελική περιοχή (Hatzidakis, Tsatsakis et al. 2002). Τα πεπτίδια απομονώθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) και αφού λυοφιλοποιήθηκαν, αποθηκεύτηκαν στους -20C.

Πίνακας. 2.1 Αμινοξικές αλληλουχίες συνθετικών πεπτιδίων.

Πεπτίδιο	Αμινοξική αλληλουχία
V3 LAI	R K S I R I Q R G P G R A F Y
V3 ₊₁	V G S I L I Q R G P G A A F Y
V3 ₊₉	R K S I R R Q R R P K R A K Y
MUC1	P A H G V T S A P D T R P A P G S T A P

2.3 Παρασκευή λιποπεπτιδίων και λιποσωμάτων

Τα HIV-1 gp120/V3 (LAI) πεπτίδια μετατράπηκαν σε λιποπεπτίδια με ομοιοπολική πρόσδεση του μορίου serine-S[2,3-bis (palmitoyloxy)-(2rs) propyl]-n-palmytoyl-(r)cysteine (Boehringer, Mannheim Biochemica, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την παρασκευή των λιποσωμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αφυδάτωση-ενυδάτωση η οποία έχει περιγραφεί από τον Kirby *et al.* Συνοπτικά, 0.5μmol φωσφατιδυλοχολίνη (100mg/ml, Sigma), 0.5μmol χολεστερόλης (10mg/ml) και 50μg πεπτιδίου (λίποV3 LAI) αναμείχθηκαν σε διάλυμα οργανικών διαλυτών (1/2 χλωροφόρμιο σε μεθανόλης). Το διάλυμα στεγνώθηκε σε σταθερή ροή αζώτου και το λιποπρωτεϊνικό μίγμα επαναδιαλύθηκε σε 0.5ml απιονισμένου νερού (dH₂O) και 0.5ml (1X)PBS. Ομογενοποίηση του διαλύματος πραγματοποιήθηκε με υπερήχους (sonication) για 2 λεπτά και στην συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 14000 στροφές για 30 λεπτά. Τελειώνοντας, το διάλυμα ψύχθηκε σε υγρό άζωτο και λυοφιλοποιήθηκε στους 18⁰C για 18 ώρες. Ανασύσταση των λιποσωμάτων πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 100 μl PBS (1X) και τα λιποσώματα επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 4⁰C. Ακολούθησαν 3 φυγοκεντρήσεις με 1ml PBS (1X) στις 14000 στροφές για 10 λεπτά για τον καθαρισμό των λιποσωμάτων.

Χημικά / ραδιενεργά υλικά

- Εντεροτοξίνη Α του σταφυλόκοκκου (Staphylococcal enterotoxin A, SEA) (Sigma-Aldrich Chemical Co)
- ³H θυμιδίνη (Amersham, U.K.)

2.4 Απομόνωση περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος (PBMC)

Buffy coats από HIV-1 και CMV όρο-αρνητικούς δότες παραχωρήθηκαν από το τμήμα αιμοδοσίας του Βενιζελείου Νοσοκομείου. Κάθε δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 στροφές για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να επιτευχθεί διαχωρισμός των κυτταρικών πληθυσμών. Τα λευκοκύτταρα (μεσαία στιβάδα) αναμείχθηκαν με διάλυμα (1X) PBS ώστε να δώσουν συνολικό όγκο 25ml. Στην συνέχεια επιστρώθηκαν πάνω από διάλυμα φικόλης (25ml) και φυγοκεντρήθηκαν στις 1500 στροφές για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ο διαχωρισμός των κυτταρικών πληθυσμών ανάλογα με την πυκνότητα τους, έχει ως αποτέλεσμα την απομόνωση των περιφερειακών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος τα οποία μεταφέρθηκαν σε διάλυμα PBS (1X). Ακολούθησαν 3 φυγοκεντρήσεις με 1X PB, στις 1500 στροφές για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για τον καθαρισμό των κυττάρων από υπολείμματα πλάσματος, φικόλης και αιμοπεταλίων. Το λαμβανόμενο κυτταρικό κλάσμα σε καθαρή κατάσταση αποτελείται κατά 90% από περιφερικά λεμφοκύτταρα (PBL) και κατά 10% μονοκύτταρα. Τα κύτταρα στην συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό υλικό RPMI που περιείχε 5% ανθρώπινο ορό. Τα κύτταρα επωάζονται 3 μέρες με τα λιποσώματα και στην συνέχεια προστίθεται η εντεροτοξίνη.

2.5 Απομόνωση CD8 κυττάρων με μαγνητικό διαχωρισμό (magnetic cell sorting, MACS)

Η απομόνωση CD8 T λευκοκυττάρων πραγματοποιήθηκε με μαγνητική επιλογή κυττάρων (MACS, Miltenyi Biotech, Germany) εφαρμόζοντας θετική επιλογή με την χρήση αντισωμάτων που δεσμεύουν τα CD8 κύτταρα. Συνοπτικά, επιθυμητός αριθμός κυττάρων φυγοκεντρήθηκαν στις 1300 στροφές για 10 λεπτά και στην συνέχεια επώαστηκαν στους 4 °C για 10 λεπτά με 10μl anti-Human CD8-RPE και 40μl MACS Buffer για κάθε 10^7 συνολικού αριθμού κύτταρων. Μετά την επώαση τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 1300 στροφές και ακολούθησε επώαση 15 λεπτών με 20μl anti-RPE MicroBeads και 30μl MACS buffer για κάθε 10^7 συνολικού αριθμού κύτταρων. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν με MACS Buffer 10-20x του labeling όγκου στις 1500 στροφές για 10 λεπτά και αφού επαναδιαλύθηκαν σε 500μl MACS buffer. Στην συνέχεια με την χρήση της κολώνας διαχωρισμού CS (Miltenyi Biotech, Germany) επιτεύχθηκε μαγνητικός διαχωρισμός των κυττάρων.

Χημικά / Διαλύματα

- ρυθμιστικό διάλυμα MACS Buffer: PBS,pH 7.2, 0.5% BSA, 2mM EDTA
- anti-Human CD8-RPE (BD Pharmigen, Greece)
- anti-RPE MicroBeads(Miltenyi Biotech, Germany)

2.6 Μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων με ενσωμάτωση [³H] θυμιδίνης

Για τις μελέτες του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων, 10^6 κατεργασμένα PBMC ανά ml στρώθηκαν σε πλάκες 96 πηγαδιών επίπεδης βάσης (Costar). Η προσθήκη των κατάλληλων λιποσωμάτων έγινε στην αρχή του πειράματος και η ενεργοποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη SEA (staphylococcal enterotoxin A) κατά την τρίτη μέρα του πειράματος. Η μέτρηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων

επιτεύχθηκε με την προσθήκη ραδιενεργού θυμιδίνης σε καθορισμένα χρονικά διαστήματα (μέρες 3, 5, 7, 9, 11 και 13). Μετά από 18 ώρες επώασης με 1 μC θυμιδίνης/πηγάδι τα κύτταρα συλλέχθηκαν σε ειδικά φίλτρα (Scatron Instruments, Norway) και η ραδιενέργεια μετρήθηκε σε β -μετρητή ραδιενέργειας (LS1701 beta counter-Beckman, USA).

2.7 Φαινοτυπικός προσδιορισμός κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (fluorescence activated cell sorting, FACS)

Για τα πειράματα φαινοτυπικού προσδιορισμού των λεμφοκυττάρων, 10^6 κατεργασμένα PBMC ανά ml στρώθηκαν σε πλάκες 24 πηγαδιών επίπεδης βάσης (Costar). Στις επιθυμητές χρονικές στιγμές, $0,5 \times 10^6$ κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν 2 φορές με 1 x PBS στις 1500 στροφές για 10 λεπτά για τον καθαρισμό τους από τα υλικά τις καλλιέργειας. Στην συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με 20 μl του κατάλληλου αντισώματος (Πιν. 2.2) και 100 μl PBS, που περιείχε 2% FBS, για 20 λεπτά στους 4 $^{\circ}\text{C}$. Στα πειράματα με τα V3 Fluo πεπτιδία τα κύτταρα επώαστηκαν για 20 λεπτά με 100 ng/ml πεπτιδίου. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των κυττάρων με 1 x PBS στις 1300 στροφές για 10 λεπτά στους 4 $^{\circ}\text{C}$ για τον καθαρισμό των κυττάρων από τα αντισώματα που προσδέθηκαν στου υποδοχείς. Τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 500 μl 1x PBS και μετρήθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής FACS Scan (Becton Dickinson, Germany) με την χρήση του λειτουργικού προγράμματος CELL Quest 3.3 (Becton Dickinson, Germany).

Χημικά / Διαλύματα

- Διάλυμα 1x PBS (Phosphate Buffered Solution): NaCl 9 gr/L, KH_2PO_4 0,21 gr/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.72 gr/L, pH 7.3
- 2% Heat inactivated Foetal calf serum (FBS)

Πίνακας. 2.2. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον φαινοτυπικό προσδιορισμό των κυττάρων.

Είδος αντισώματος	Κλώνος	Εταιρία προέλευσης
anti-Human CD4 RPE-Cy5	RPA-T4	
anti-Human CCR5 RPE	2D7/CCR5	
anti-Human CXCR4 RPE	12G5	
anti-Human CD45RO FITC	UCHL-1	(BD Pharmigen, Greece)
anti-Human CD8 RPE	HIT8a	
anti-Human CD95 RPE	DX2	
anti-Human CD25 RPE	M-A251	
anti-Human CD38 RPE	HB7	Daco, Copenhagen, Denmark
anti-Human CD3 RPE	MT310	

2.8 Μέτρηση απόπτωσης

Η μέτρηση της απόπτωσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας Annexin V και ιωδιούχο προπίδιο (για τον διαχωρισμό των νεκρωτικών κυττάρων από τα αποπτωτικά). Ακολουθώντας την βασική πειραματική διεργασία, με την προσθήκη λιποσωμάτων και SEA, $0.5 \cdot 10^6$ κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν 2 φορές με 1 x PBS στις 1500 στροφές για 10 λεπτά. Στην συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με 2μl Annexin V και 2μl ιωδιούχο προπίδιο σε 100μl διαλύματος πρόσδεσης (Annexin-V binding Buffer) για περίπου 15 λεπτά. Μετά την επώαση τα κύτταρα αραιώθηκαν σε τελικό όγκο 500 μl και η απόπτωση των κυττάρων μετρήθηκε στον κυτταρομετρητή ροής FACS Scan (Becton Dickinson, Germany) με την χρήση του λειτουργικού προγράμματος CELL Quest 3.3 (Becton Dickinson, Germany).

Χημικά / Διαλύματα

- Annexin V-Fluos (Boehringer-Mannheim Biochemica, Germany)
- Ιωδιούχο προπίδιο (ICN Biochemicals Inc.)
- Διάλυμα πρόσδεσης Annexin V-Fluos: 10mM HEPES/NaOH, 140mM NaCl, 5mM CaCl₂ in pH 7.4
- Διάλυμα 1x PBS (Phosphate Buffered Solution): NaCl 9 gr/L, KH₂PO₄ 0,21 gr/L, Na₂HPO₄-7H₂O 0.72 gr/L, pH 7.3

2.9 Μετρήσεις ενδοκυτταρικού ασβεστίου στον κυτταρομετρητή ροής

Για τις μετρήσεις ενδοκυτταρικού ασβεστίου, $0.5 \cdot 10^6$ κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 1300 στροφές για 10 λεπτά και επαναδιαλύθηκαν σε RPMI-1640 με 2% FBS και 4μM FLUO-3 acetoxymethylester. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και κατά την διάρκεια αυτή προστέθηκε και αντίσωμα anti-human CD4 PE-Cy5. Στην συνέχεια τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν 2 φορές στις 1300 στροφές για 10 λεπτά με Hank's balanced solution. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε ανάλυση στον κυτταρομετρητή ροής (Callibur, Becton–Dickinson, US).

Χημικά / Διαλύματα

- RPMI-1640 (Gibco)
- anti-human CD4 PE-Cy5 (Mouse IgG1,k, RPA-T4) (BD Pharmigen, Greece)
- Δείκτης Ca²⁺ : Fluo-3 AM (acetoxymethylester) (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands)
- Ca²⁺ Flux assay buffer : Hank's balanced salt solution, 20mM HEPES, 0.2% Bovine serum albumin (BSA), pH 7.4

Hank's balanced salt solution:

- 0.137 M NaCl
- 5.4 mM KCl
- 0.25 mM Na₂H PO₄

- 0.44 mM KH_2PO_4
- 1.3 mM CaCl_2
- 1.0 mM MgSO_4
- 4.2 mM NaHCO_3
- 0.1% glucose

2.10 αλληλεπίδρασης του V3 πεπτιδίου με τους υποδοχείς χημειοκινών

Για να παρατηρήσουμε την αλληλεπίδραση του V3 πεπτιδίου με τους υποδοχείς χημειοκινών χρησιμοποιήθηκαν U87 κύτταρα διαμολυσμένα με τον υποδοχέα CD4 (καλλιέργεια ελέγχου), και με τους υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν κατά την διάρκεια της νύχτας σε πλάκες 12 πηγαδιών επίπεδης βάσης (Costar) στις οποίες είχαν τοποθετηθεί αποστειρωμένες καλυπτρίδες. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα φιξαρίστηκαν επάνω στην καλυπτρίδα με 2% φορμαλδεΐδη (Polysciences Europe, Germany) για 15 λεπτά. Στην συνέχεια καθαρίστηκαν με 1 x PBS, για να απομακρυνθεί η φορμαλδεΐδη, και επώαστηκαν για 10 λεπτά με 1pg/ml V3-FLUOS ή MUC-1-FLUOS πεπτίδια. Ύστερα από ένα γρήγορο πλύσιμο με 1 x PBS, τοποθετήθηκε Mounting solution (Sigma-Aldrich Chemical Co, M-7534) στις καλυπτρίδες και τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο με την μέθοδο Nomarsky (Bio-Rad, Radiance 2100 confocal with a krypton-argon laser linked to a Zeiss Axioskop 2 plus microscope)

2.11 Ημιοσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (q RT-PCR)

Η Real-time PCR πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή Stratagene MX3000P (La Jolla, CA, USA) χρησιμοποιώντας την χρωστική Brilliant SYBR green QPCR Master Mix (Stratagene) και την ROX σαν παθητική χρωστική. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 20 μl με 1 μl δείγματος cDNA. Σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH. Οι εκκινητές των γονιδίων

παρουσιάζονται στον πίνακα 2.3. Για την ιντερλευκίνη-2 χρησιμοποιήθηκαν 0.4μM από κάθε εκκινιτή. Αρχικά έγινε θερμική αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 10 λεπτά και ακολούθησαν 40 κύκλοι για 30 δευτερόλεπτα στους 95 °C (αποδιάταξη), 30 δευτερόλεπτα στους 56 °C (υβριδισμός των εκκινητών) και 30 δευτερόλεπτα στους 72°C (πολυμερισμός). Για τον YY1 χρησιμοποιήθηκαν 0,3μM από κάθε εκκινιτή και παρέμειναν οι ίδιες συνθήκες στην αντίδραση PCR όπως και στην IL-2 εκτός από την θερμοκρασία υβριδοποίησης που ήταν στους 58 °C. Για τον μεταγραφικό παράγοντα NFAT5 χρησιμοποιήθηκαν 0.4μM από κάθε εκκινιτή και η θερμοκρασία υβριδοποίησης ήταν στους 57 °C για 1 λεπτό. Για το Kras χρησιμοποιήθηκαν 0.4μM από κάθε εκκινιτή και η θερμοκρασία υβριδοποίησης ήταν στους 60 °C για 30 δευτερόλεπτα. Τέλος για το γονίδιο αναφοράς GAPDH χρησιμοποιήθηκαν 0.4μM από κάθε εκκινιτή και η θερμοκρασία υβριδοποίησης ήταν στους 57 °C για 30 δευτερόλεπτα.

Πίνακας 2.3. Αλληλουχίες εκκινητών

Ζεύγη Εκκινιτών	Αλληλουχία (5' - 3')
IL-2	FWD: TCACCAGGATGCTCACATTTAAGT RVS: GAGGTTTGAGTTCTTCTTCTAGACACTGA
NFAT	FWD: CAGAGGCCGGGGGTCAA RVS: AGGGCTCTTCTTTACTCCAGTTCC
YY1	FWD: GGAATACCTGGCATTGACC RVS: TCTTTGTGCAGCCTTTATGAG
Kras	FWD: GGGGAGGGCTTTCTTTGTGTA RVS: GTCCTGAGCCTGTTTTGTGTC
GAPDH	FWD: GGAAGGTGAAGGTCCGAGTCA RVS: GTCATTGATGGCAACAATATCCACT

2.12 Απομόνωση ολικού RNA από πρωτογενή λεμφοκύτταρα

Η απομόνωση ολικού RNA από τα πρωτογενή λεμφοκύτταρα πραγματοποιήθηκε με τα αντιδραστήρια RNeasy (QIAGEN, Germany). Συνοπτικά τα κύτταρα συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση στις 1300 στροφές για 10 λεπτά και στην συνέχεια λύθηκαν με την προσθήκη 600 µl RLT buffer για κάθε 5×10^6 κύτταρα. Ακολούθησε ομογενοποίηση των δειγμάτων με σύριγγα 20G και προστέθηκαν 600 µl 70% αιθανόλης. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στα ειδικές κολώνες της Qiagen και φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 στροφές για 15 δευτερόλεπτα έτσι ώστε το RNA να παραμείνει στα ειδικά φίλτρα και το υπόλοιπο υλικό να περάσει. Στην συνέχεια προστέθηκαν 500 µl RW1 buffer και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10000 στροφές για 15 δευτερόλεπτα. Ακολουθούν 2 φυγοκεντρήσεις με 500 µl RPE buffer στις 10000 στροφές για 15 δευτερόλεπτα η πρώτη και 2 λεπτά η δεύτερη. Στο τέλος προστέθηκαν 40 µl dH₂O κατεργασμένο DEPC και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 10000 στροφές για να συλλεχτεί το ολικό RNA.

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του RNA προσδιορίστηκε με φωτομέτρηση σε υπεριώδες φασματοφωτόμετρο στα 260nm και 280nm. Η ακεραιότητα του RNA αξιολογήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε 2% ηλεκτρώματος αγαρόζης.

Διαλύματα απομόνωσης RNA

- RLT buffer (QIAGEN, Germany)
- RW1 buffer (QIAGEN, Germany)
- RPE buffer (QIAGEN, Germany)
- β-μερκαπτοαιθανόλη (Sigma-Aldrich Chemical Co)
- DEPC (Sigma-Aldrich Chemical Co)
- dH₂O κατεργασμένο DEPC

2.13 Μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA

Οι μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA πραγματοποιήθηκαν από την εταιρία Aros Applied Biotechnology (Denmark) χρησιμοποιώντας πλατφόρμες της εταιρίας Affymetrix (Human Genome U133 Plus 2.0 Array) που περιείχαν πάνω από 47.000 μετάγραφα συμπεριλαμβανομένων και 38.500 γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Πιο συγκεκριμένα, ολικό RNA απομονώθηκε 8 ώρες μετά την προσθήκη του SEA από ανθρώπινα πρωτογενή λεμφοκύτταρα από τα οποία είχαν αφαιρεθεί τα CD8 κύτταρα με μαγνητικό διαχωρισμό. Κύτταρα προερχόμενα από τον ίδιο δότη καλλιεργήθηκαν σε πλάκες 12 πηγαδιών επίπεδης βάσης (Costar). 6 πηγάδια περιείχαν κύτταρα που επώαστηκαν με λιποσώματα που έφεραν το V3 πεπτίδιο και 6 πηγάδια με κύτταρα που επώαστηκαν με λιποσώματα χωρίς το πεπτίδιο. Κάθε πηγάδα καλλιεργήθηκε και επεξεργάστηκε διαφορετικά με αποτέλεσμα να απομονωθεί RNA από 12 διαφορετικά πηγάδια. Ύστερα από φωτομέτρηση σε υπεριώδες φασματοφωτόμετρο και αξιολόγηση της ακεραιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση 3 δείγματα από κάθε περίπτωση με ποσότητα πάνω από 1μg στάλθηκε στην εταιρία Aros για περαιτέρω ανάλυση.

Στα εργαστήρια της Aros πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ποιότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε *in vitro* transcription των δειγμάτων RNA για την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας cDNA. Ακολούθησε ο υβριδισμός των μεμβρανών και η συλλογή των αποτελεσμάτων. Ύστερα από την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων και την στατιστική ανάλυση τα αποτελέσματα στάλθηκαν στο εργαστήριο μαζί με όλα τα δεδομένα από τις μετρήσεις.

3.Αποτελέσματα

3.1 Μελέτη της επίδραση της V3 περιοχής του HIV-1 στα T κύτταρα κατά την διάρκεια γενικευμένης αντιγονικής διέγερσης

3.1.1 Εισαγωγή

Η μόλυνση από τον ιό HIV-1 χαρακτηρίζεται από τη βαθμιαία απώλεια των CD4 T κυττάρων που οδηγεί στην ανάπτυξη της επίκτητης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (AIDS) (Clerici, Stocks et al. 1989; McCune 2001; Mohri, Perelson et al. 2001). Αν και ο ακριβής μηχανισμός ελάττωσης των CD4 T κυττάρων είναι ακόμα υπό διερεύνηση (Roumier, Castedo et al. 2003) (Dockrell, Badley et al. 1999) (Petit, Arnoult et al. 2003), η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος έχει συνδεθεί με την εξαφάνιση των μη μολυσμένων ενεργοποιημένων/αναμνηστικών CD4/CD45RO T κυττάρων κατά την διάρκεια της ασυμπτωματικής φάσης (Heinkelein, Muller et al. 1997; Sloand, Young et al. 1997). Διάφορες ιικές πρωτεΐνες έχουν εμπλακεί στην παθογένεση του ιού HIV (Akari, Bour et al. 2001; Gulow, Kaminski et al. 2005 {Yang, 2003 #14; Yedavalli, Shih et al. 2005), με την γλυκοπρωτεΐνη gp120 του ιικού φακέλου να φέρεται ότι διαδραματίζει βασικό ρόλο στη μείωση των CD4 T κυττάρων (Laurent-Crawford, Krust et al. 1993; Ohnismus, Heinkelein et al. 1997; Krambovitis, Porichis et al. 2005).

Δεδομένου ότι ο ιός HIV μολύνει κατά προτίμηση τα ενεργοποιημένα CD4 T κύτταρα (Rosenberg, Billingsley et al. 1997; Hazenberg, Hamann et al. 2000), και η βασική λειτουργία αυτών των κυττάρων είναι να αλληλεπιδρούν με επαγγελματικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, έχουμε περιγράψει, σε προγενέστερες μελέτες, μια δυσλειτουργία στην διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης προκαλούμενη από ιικές πρωτεΐνες (Zafiropoulos, Baritaki et al. 2001; Zafiropoulos, Baritaki et al. 2001). Πιο συγκεκριμένα, η τρίτη μεταβλητή περιοχή (V3) της γλυκοπρωτεΐνης gp120, όταν βρίσκεται στην επιφάνεια ενός μακρόφαγου, εμφανίζεται να αλληλεπιδρά τουλάχιστον με το υποδοχέα χημειοκινών CCR5 ενός αποκρινόμενου αναμνηστικού CD4/CD45RO T προκαλώντας έντονη ενεργοποίηση ακολουθούμενη από αυξημένο κυτταρικό θάνατο (Baritaki, Zafiropoulos et al. 2002). Στις συγκεκριμένες μελέτες χρησιμοποιήθηκε το τοξοειδές του τετάνου ως αναμνηστικό αντιγόνο και επομένως ο πληθυσμός των T κυττάρων που επηρεάστηκαν από το φαινόμενο περιοριζόταν στα αναμνηστικά CD4/CD45RO T κύτταρα του τετάνου με μια προσδοκώμενη συχνότητα 1 στα 10^5 - 10^6 T κύτταρα.

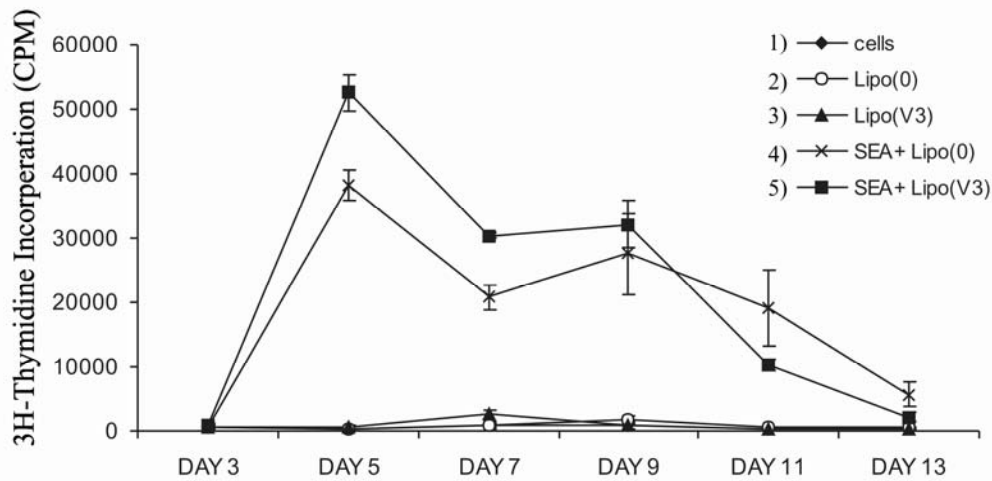
Αν και η προσέγγιση της ειδικής αντιγονοπαρουσίασης του τετάνου ήταν επαρκής για να αναδειχθεί το φαινόμενο του V3 κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης, η χαμηλή συχνότητα της απάντησης των CD4 T κυττάρων περιόριζαν την περαιτέρω μελέτη του συστήματος για τη διερεύνηση των ενδοκυτταρικών μονοπατιών του V3 φαινομένου. Προκειμένου να ξεπεραστεί το συγκεκριμένο εμπόδιο, επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε ένα υπερ-αντιγόνο το οποίο χρησιμοποιεί τον TCR υποδοχέα και έχει αναφερθεί ότι ενεργοποιεί μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων μέσω ενός γενικού ψευδο-αντιγονικού σήματος. (Llewelyn and Cohen 2002) (Proft and Fraser 2003)

Πρωταρχικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να μελετήσουμε τις παραμέτρους του καινούργιου πειραματικού μοντέλου και να διερευνήσουμε εάν το V3 πεπτίδιο εξακολουθεί να προκαλεί κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση κατά την διάρκεια μιας πιο γενικευμένης ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα πολλαπλασιασμού των κυττάρων, φαινοτυπική ανάλυση των υποπληθυσμών των T κυττάρων, μετρήσεις απόπτωσης και πειράματα βελτιστοποίησης του φαινομένου με απομάκρυνση των CD8 κυττάρων και προσθήκη ιντερλευκίνης 2.

3.1.2 Επίδραση της V3 περιοχής κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την αντικατάσταση του τετανοειδικού μοντέλου από ένα πιο γενικευμένο σήμα που θα οδηγεί στην ενεργοποίηση περισσότερων T κυττάρων και θα διατηρεί παράλληλα το φαινόμενο του V3. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η εντεροτοξίνη A (SEA) που παράγεται από τον σταφυλόκοκκο και ενεργοποιεί περίπου 25% των T κυττάρων (Hudson, Robinson et al. 1993; Li, Llera et al. 1999). Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει την επώαση των κυττάρων με λιποσώματα που φέρουν ή όχι το λιποπεπτίδιο V3 στην επιφάνεια τους έτσι ώστε τα V3 πεπτίδια να τοποθετηθούν στην επιφάνεια των μακροφάγων υστερα από την συντηξη της κυτταρικής μεμβράνης με τα λιποσώματα. Πειράματα πολλαπλασιασμού των κυττάρων με ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στο DNA, έδειξαν ότι η παρουσία

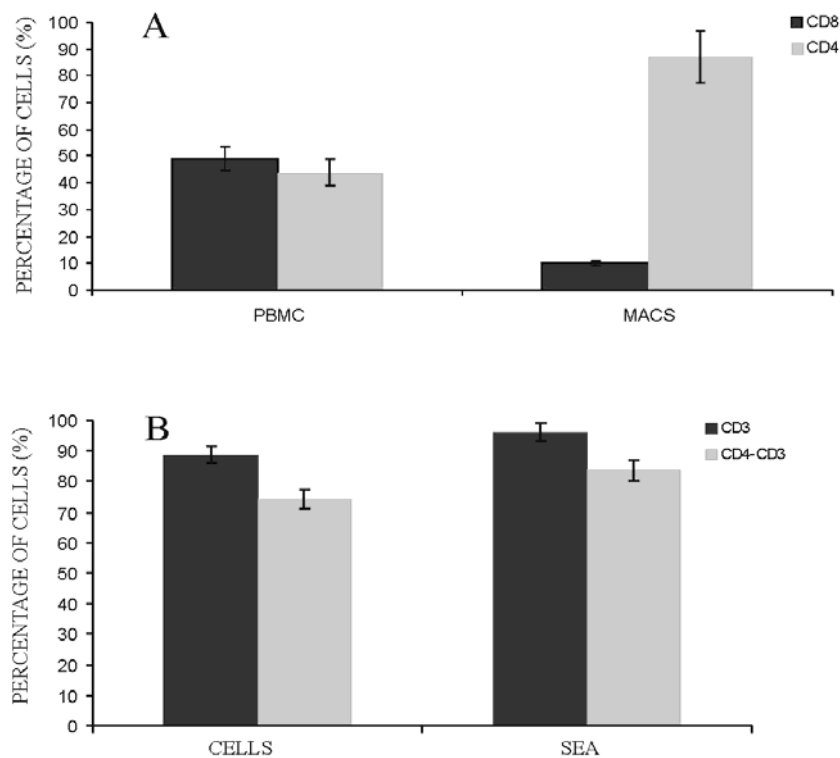
του V3 πεπτιδίου στην επιφάνεια των μακροφάγων κατά την διάρκεια ενεργοποίησης με το SEA, προκάλεσε ενισχυμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου που επωάστηκαν με λιποσώματα χωρίς επιφανειακή κάλυψη πεπτιδίου (Εικ. 3.1). Κύτταρα που δεν επωάστηκαν με την εντεροτοξίνη δεν παρουσίασαν σημαντική ενεργοποίηση και η παρουσία του V3 δεν είχε καμία επιρροή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Συνεπώς, το φαινόμενο του ενισχυμένου πολλαπλασιασμού που προκαλεί το V3 πεπτίδιο κατά την διάρκεια της ειδικής αντιγονοπαρουσίασης διατηρείται και στο καινούργιο μοντέλο με το υπερ-αντιγόνο. .



Εικ 3.1. Μέτρηση πολλαπλασιασμού των κυττάρων με ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στο DNA. 1) Κύτταρα, 2) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα χωρίς το V3 πεπτίδιο, 3) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα που φέρουν το V3 πεπτίδιο, 4) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα χωρίς το V3 πεπτίδιο, παρουσία του υπερ-αντιγόνου SEA και 5) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα που φέρουν το V3 πεπτίδιο, παρουσία του υπερ-αντιγόνου SEA. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από τρία ανεξάρτητα πειράματα σε τρεις διαφορετικούς δότες.

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης των T κυττάρων από το SEA έγκειται στην μη ειδική πρόσδεση της τοξίνης με το τάξης 2 μόριο του κυρίου συμπλόκου

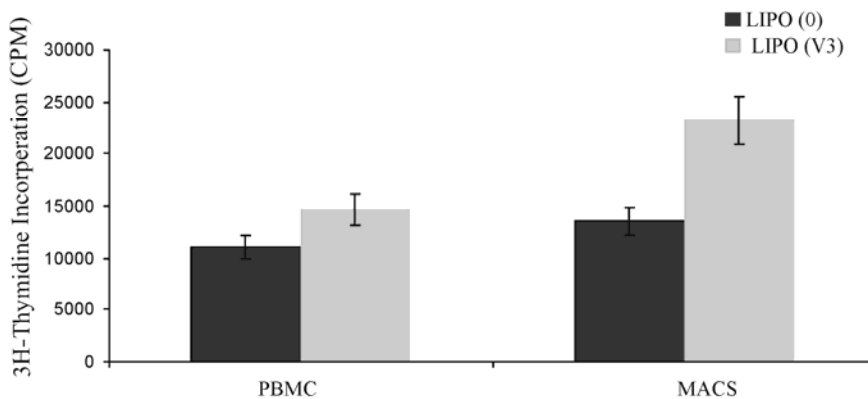
ιστοσυμβατότητας, που βρίσκεται στην επιφάνεια των επαγγελματικών αντιγόνοπαρουσιαστικών κυττάρων, και με την μεταβλητή περιοχή της β-αλυσίδας του υποδοχέα των T κυττάρων (TCR) (Champagne, Huchenh et al. 1993). Η πρόσδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση όχι μόνο των CD4 T κυττάρων αλλά και των CD8 (White, Herman et al. 1989). Αυτή η ιδιότητα της τοξίνης έχει αρνητικές επιπτώσεις στην μελέτη του φαινομένου λόγω του ότι το V3 φαινόμενο έχει παρατηρηθεί μόνο στα ενεργοποιημένα CD4 T κύτταρα και όχι στα CD8. Γι' αυτό το σκοπό τα CD8 κύτταρα απομακρύνθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό πετυχαίνοντας εμπλουτισμό των κυττάρων με CD4 κύτταρα (περίπου 80%) (Εικ. 3. 2 Α). Μετά από επώαση με την εντεροτοξίνη το ποσοστό των T κυττάρων αγγίζει το 90% με τα CD4 να αποτελούν περίπου το 85% (Εικ. 3. 2 Β).



Εικ. 3. 2. Α) Φαινοτυπική ανάλυση των CD4 και CD8 κυττάρων σε περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα του αίματος (PBMC) πριν και μετά από μαγνητικό διαχωρισμό (MACS). Β) Φαινοτυπική ανάλυση των CD3 και CD3/CD4 κυττάρων μετά από μαγνητικό διαχωρισμό υπό την παρουσία ή όχι του υπεραντιγόνου SEA.

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από δύο ανεξάρτητα πειράματα σε δύο διαφορετικούς δότες.

Η απομάκρυνση των CD8 κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα την βελτιστοποίηση του φαινομένου αφού η διάφορα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που επώαστηκαν με το V3 σε σύγκριση με τις καλλιέργειες έλεγχου έχει αυξηθεί (Εικ. 3. 3). Επομένως, για να μελετηθεί εκτενέστερα το V3 φαινόμενο στο *in vitro* σύστημα και να διερευνηθούν τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ενισχυμένη ενεργοποίηση των CD4 T κυττάρων είναι επιτακτική η απομάκρυνση των CD8 T κυττάρων με μαγνητικό διαχωρισμό.

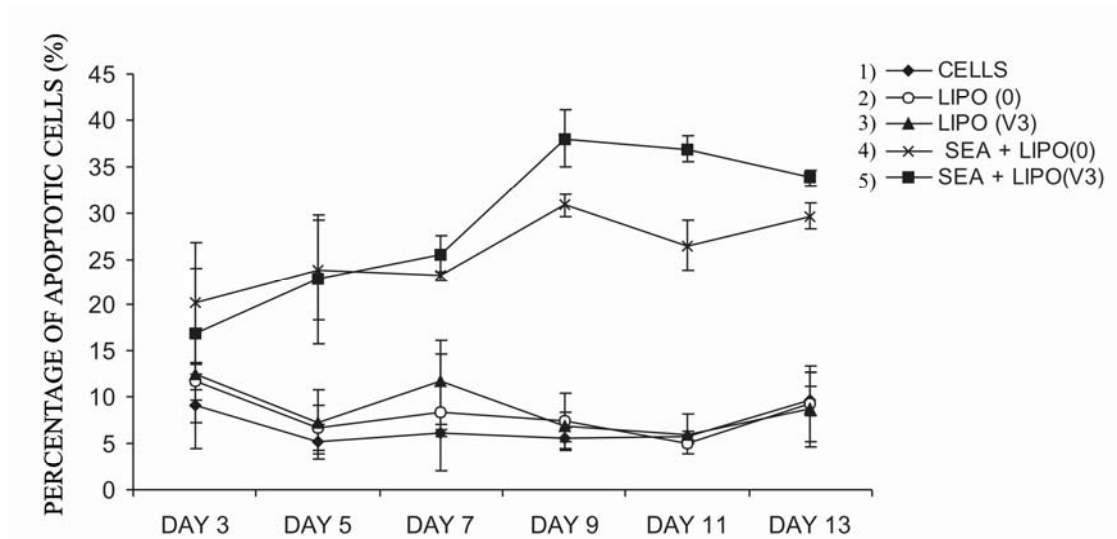


Εικ 3.3. Μέτρηση πολλαπλασιασμού περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος (PBMC) και μετά από μαγνητικό διαχωρισμό (MACS) όπως μετρήθηκαν με ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στο DNA. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το υπερ-αντιγόνο SEA, παρουσία ή όχι του V3 πεπτιδίου. Οι τιμές απεικονίζουν τις μετρήσεις κατά την ημέρα με το μέγιστο πολλαπλασιασμό και αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από τρία ανεξάρτητα πειράματα σε τρεις διαφορετικούς δότες.

3.1.3 Μέτρηση της απόπτωσης των T κυττάρων

Η ενισχυμένη ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων που προκαλεί το V3 πεπτιδίο ακολουθεί από μια απότομη μείωση του πολλαπλασιασμού η οποία σε μελέτες του τετανοειδικού συστήματος είχε αποδοθεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο λόγω απόπτωσης. Για να μελετήσουμε τον κυτταρικό θάνατο στο πειραματικό μοντέλο του υπεραντιγόνου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των κυττάρων στον κυτταρομετρητή ροής χρησιμοποιώντας annexin-V, ως αποπτωτικό μαρτυρά, και ιωδιούχο προπίδιο ως νεκρωτικό μαρτυρά. Η annexin-V είναι μια φθορίζουσα ουσία που έχει την ιδιότητα να προσδέεται σε μόρια φωσφατιδυλοσερίνης, η οποία είναι ένα φωσφολιπίδιο που εξέρχεται στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης του κυττάρου κατά τα πρώιμα αποπτωτικά στάδια. Το ιωδιούχο προπίδιο έχει την ιδιότητα να προσδέεται στο DNA των νεκρωτικών κυττάρων όπου η πλασματική μεμβράνη έχει αποδιοργανωθεί και καθιστά δυνατή την είσοδο της ουσίας στο κύτταρο. Επομένως, κύτταρα που φαίνονται στον κυτταρομετρητή ροής να είναι σημασμένα και με της δύο χρωστικές αποτελούν νεκρωτικά κύτταρα ενώ αυτά που είναι σημασμένα με την annexin-V αποτελούν τα αποπτωτικά κύτταρα.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι το V3, παρουσία του SEA, προκαλεί αυξημένα ποσοστά αποπτωτικών κυττάρων σε σύγκριση με τις καλλιέργειες έλεγχου (Εικ. 3.4). Τα αυξημένα ποσοστά των αποπτωτικών κυττάρων, εξαιτίας του V3 πεπτιδίου, παρατηρούνται τις χρονικές περιόδους που παρουσιάζεται η απότομη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Εικ. 3.1) γεγονός που αποδεικνύει ότι η απότομη ελάττωση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οφείλετε στην επαγωγή της απόπτωσης. Στις καλλιέργειες που δεν προστέθηκε η τοξίνη, τα ποσοστά των αποπτωτικών κυττάρων είναι μειωμένα και η παρουσία του V3 πεπτιδίου δεν προκαλεί έντονη απόπτωση. Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του τετανοειδικού μοντέλου και ενισχύουν το προτεινόμενο μοντέλο του κυτταρικού θανάτου επαγόμενο από ενεργοποίηση (AICD).

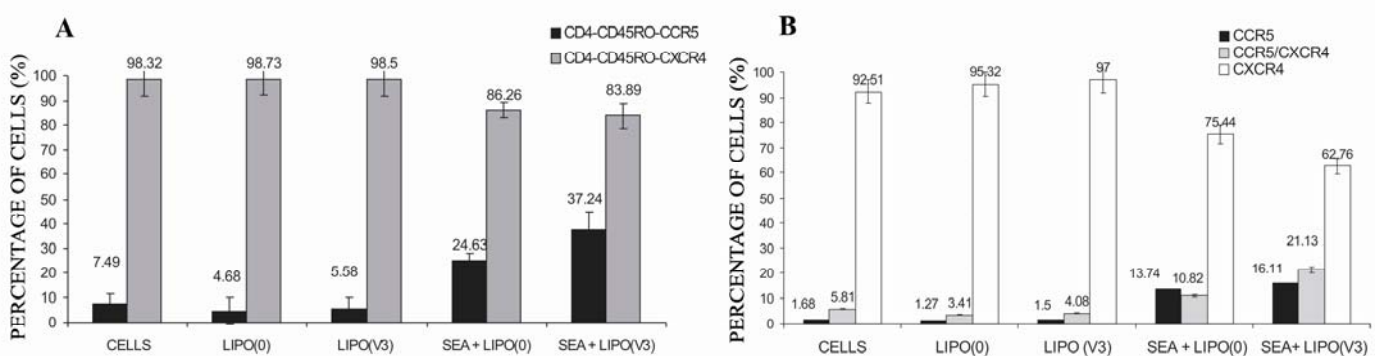


Εικ. 3.4. Κινητική ανάλυση της απόπτωσης περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος μετά από μαγνητικό διαχωρισμό. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στον κυτταρομετρητή ροής χρησιμοποιώντας annexin-V και ιωδιούχο προπίδιο. 1) Κύτταρα, 2) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα χωρίς το V3 πεπτίδιο, 3) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα που φέρουν το V3 πεπτίδιο, 4) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα χωρίς το V3 πεπτίδιο, παρουσία του υπερ-αντιγόνου SEA και 5) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα που φέρουν το V3 πεπτίδιο, παρουσία του υπερ-αντιγόνου SEA. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από τρία ανεξάρτητα πειράματα σε τρεις διαφορετικούς δότες.

3.1.4 Φαινοτυπική ανάλυση των CD4 T κυττάρων

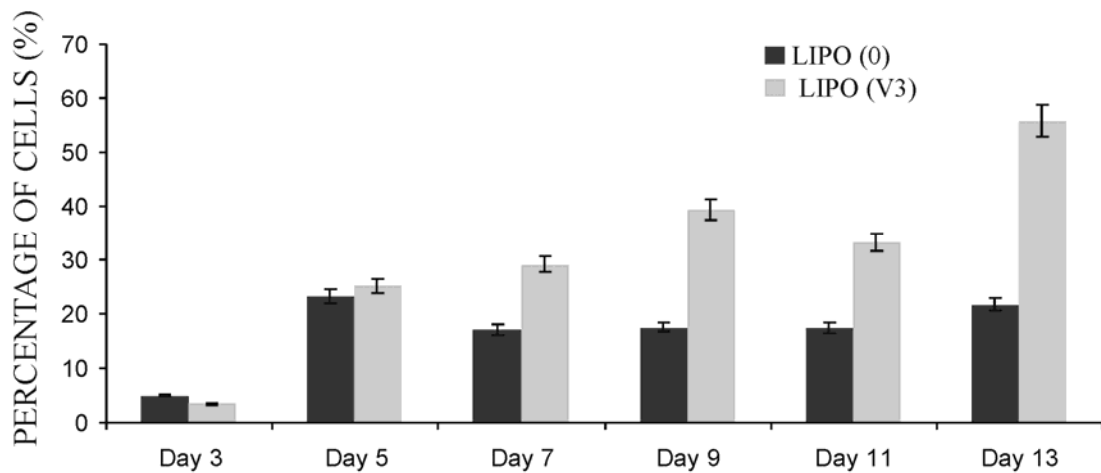
Σε μια προσπάθεια να μελετήσουμε τους υποπληθισμούς των CD4 T κυττάρων που επηρεάζονται από το V3 φαινόμενο πραγματοποιήθηκε φαινοτυπικός προσδιορισμός πρωτογενών περιφερικών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Η μέτρηση έγινε την ημέρα με την μέγιστη ενεργοποίηση και η ανάλυση έδειξε ότι ο κύριος υποπληθισμός των CD4 T κυττάρων που επηρεάζεται περισσότερο από το V3 πεπτίδιο είναι τα τριπλοθετικά CD4/CD45RO/CCR5. Ο φαινότυπος αυτός αντιστοιχεί στα ενεργοποιημένα CD4 T κύτταρα που φέρονται να είναι ο κύριος κυτταρικός πληθυσμός που επηρεάζεται κατά την HIV-1 μόλυνση στην ασυμπτωματική φάση (Rosenberg,

Billingsley et al. 1997) (Hazenberg, Hamann et al. 2000). Η παρουσία του V3 σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση του υπερ-αντιγόνου προκάλεσε μεγαλύτερη αύξηση του ποσοστού των CD4/CD45RO/CCR5 T κυττάρων σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου (Εικ 3.5 A). Αντιθέτως παρατηρείται μείωση του ποσοστού των CD4/CD45RO κυττάρων που φέρουν στην επιφάνεια τους τον υποδοχέα CXCR4. Είναι αξιοσημείωτο ότι περίπου 20% των CCR5 T κυττάρων φέρουν επίσης και τον υποδοχέα CXCR4 (Εικ. 3.5 B). Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες με την σημείωση ότι η πλειοψηφία των CCR5⁺ T κυττάρων εκφράζουν και τον CXCR4 υποδοχέα (Roy, Schweighardt et al. 2005). Είναι γενικά αποδεχτό ότι ο υποδοχέας CXCR4 απαντάται κυρίως στα παρθενικά CD4 T κύτταρα ενώ ο CCR5 σε ενεργοποιημένα/αναμνηστικά T κύτταρα (Bleul, Wu et al. 1997) (Maier, Bartolome-Rodriguez et al. 2000). Επομένως, μια πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων είναι ότι η συνύπαρξη των δυο υποδοχέων στα CD4 κύτταρα ενδεχομένως να περιγράφει ένα μεταβατικό στάδιο ενεργοποίησης των παρθενικών T κυττάρων σε ενεργοποιημένα.



Εικ. 3.5 A) Φαινοτυπική ανάλυση των υποδοχέων χημειοκινών CCR5 και CXCR4 σε CD4/CD45RO T κύτταρα χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. B) Ποσοστιαία κανονικοποίηση του CD4/CD45RO υποπληθισμού. CD4 T κύτταρα απομονώθηκαν με μαγνητικό διαχωρισμό (MACS) και συν-καλλιεργήθηκαν με μονοκύτταρα που απομονώθηκαν από 10⁶ PBMC με επιλεκτική προσκόλληση στη στερεά φάση. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν την χρονική στιγμή με το μέγιστο πολλαπλασιασμό κυττάρων. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από τρία ανεξάρτητα πειράματα σε τρεις διαφορετικούς δότες.

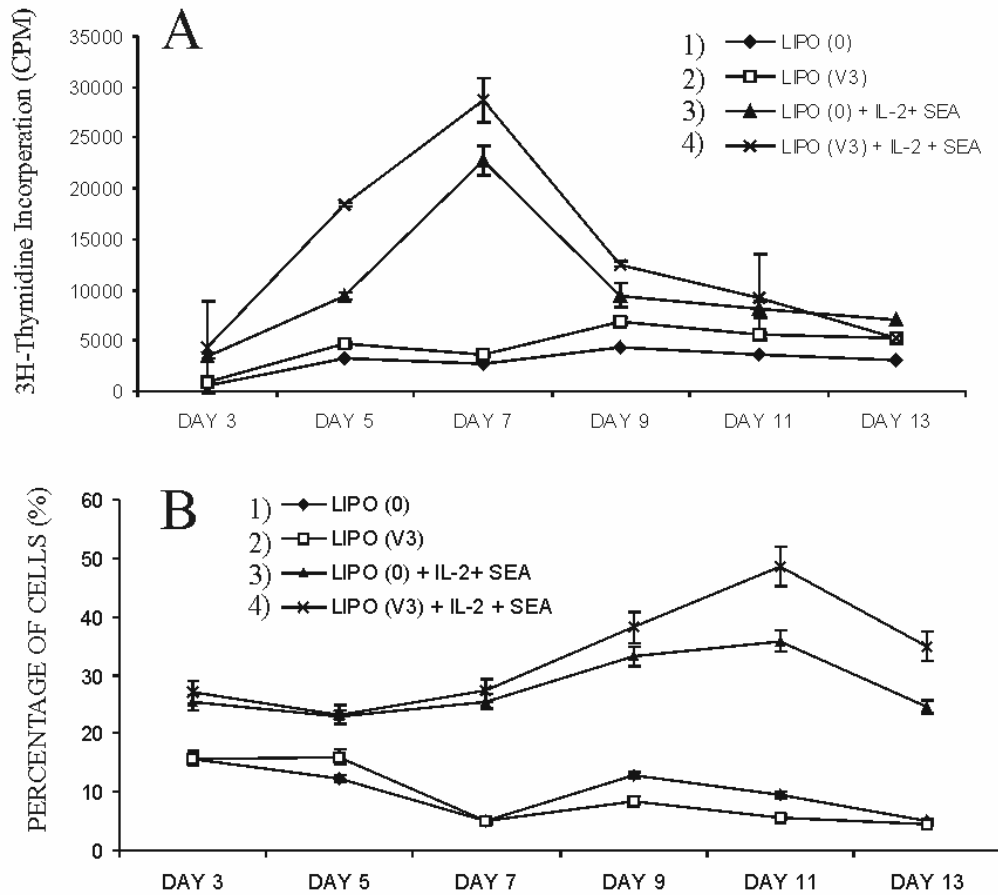
Επιπλέον φαινοτυπικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν με σκοπό να διερευνηθεί η ποσόστωση των CD4/CD45RO/CD25 T κυττάρων. Ο επιφανειακός μάρτυρας CD25 αναφέρεται στον υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2, και η έκφραση του αυξάνεται στα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Τα αποτελέσματα της εικόνας 3.6 δείχνουν ότι επώαση των κυττάρων με το υπερ-αντιγόνο και το V3 πεπτίδιο είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των CD4/CD45RO/CD25 T κυττάρων σε σύγκριση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με λυποσώματα χωρίς το V3 πεπτίδιο. Εφόσον αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που φέρουν τον συγκεκριμένο υποδοχέα αντιστοιχεί σε αυξημένο ποσοστό ενεργοποιημένων κυττάρων τότε τα συγκεκριμένα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ιδιότητα του V3 πεπτιδίου να προκαλεί έντονη ενεργοποίηση των CD4 T κυττάρων κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης.



Εικ. 3.6 Κινητική φαινοτυπική ανάλυση του υποδοχέα ιντερλευκίνης 2 (CD25) σε CD4/CD45RO T κύτταρα χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το υπερ-αντιγόνο SEA, παρουσία ή όχι του V3 πεπτιδίου. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από δύο ανεξάρτητα πειράματα σε δύο διαφορετικούς δότες.

3.1.5 Μελέτη της επίδρασης της ιντερλευκίνης 2 στο φαινόμενο του V3

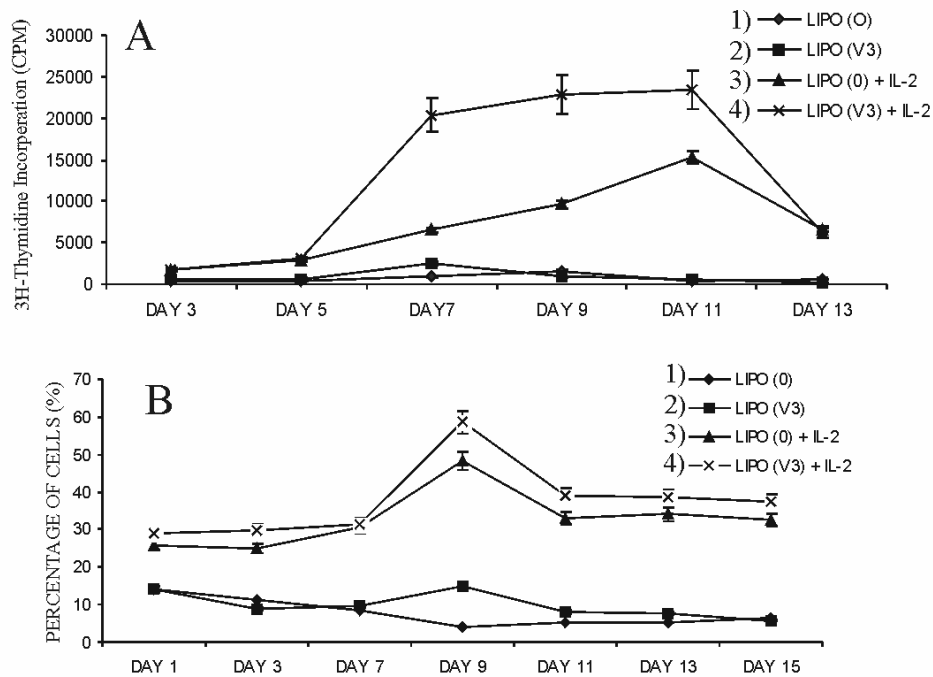
Προκειμένου να μελετήσουμε περαιτέρω το φαινόμενο και να κατανοήσουμε τον μηχανισμό παθογένειας του V3 κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα παρουσία ιντερλευκίνης 2, η οποία προστέθηκε στα κύτταρα δυο μέρες πριν την προσθήκη του υπερ-αντιγόνου. Η IL-2 έχει παρατηρηθεί ότι αυξάνει την έκφραση του υποδοχέα χημειοκινών CCR5 στα Th1 κύτταρα και ειδικότερα σε εκείνα που έχουν ενεργοποιηθεί από αντιγόνο (Loetscher, Seitz et al. 1996; Yang, Tomura et al. 2001). Ο υποδοχέας CCR5 είναι το κύριο χαρακτηριστικό των Th1 λεμφοκυττάρων και εκφράζεται στα CD4/CD45RO T κύτταρα μνήμης που είναι ο κύριος πληθυσμός που επηρεάζεται από το V3 φαινόμενο (Loetscher, Ugucioni et al. 1998). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία της ιντερλευκίνης βελτίωσε την επιρροή του V3 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου (Εικ. 3.7A). Παρομοίως, μετρήσεις απόπτωσης με την χρήση annexin-V και ιωδιούχου προπιδίου, έδειξαν ότι η προσθήκη της ιντερλευκίνης 2 αύξησε το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων που προκλήθηκε από τα V3 πεπτίδια κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης (Εικ. 3.7B). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η παρουσία της ιντερλευκίνης 2 βελτιστοποίησε το φαινόμενο του V3 κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης.



Εικ. 3.7. Μελέτη για την επιρροή της ιντερλευκίνης 2 στο V3 φαινόμενο υπο την επιρροή του SEA. **A)** Μέτρηση πολλαπλασιασμού περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος ύστερα από μαγνητικό διαχωρισμό όπως μετρήθηκαν με ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στο DNA. **B)** Κινητική ανάλυση της απόπτωσης στον κυτταρομετρητή ροής χρησιμοποιώντας annexin-V και ιωδιούχο προπίδιο 1) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα χωρίς το V3 πεπτίδιο, 2) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα που φέρουν το V3 πεπτίδιο, 3) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα χωρίς το V3 πεπτίδιο, παρουσία του υπερ-ατιγόνου SEA και IL-2 και 4) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα που φέρουν το V3 πεπτίδιο, παρουσία του υπερ-ατιγόνου SEA και IL-2. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από τρία ανεξάρτητα πειράματα σε τρεις διαφορετικούς δότες

Με σκοπό να διερευνήσουμε εκτενέστερα την επίδραση της IL-2 στο V3 φαινόμενο, πραγματοποιήθηκαν μελέτες απουσία του υπερ-αντιγόνου. Η IL-2 παράγεται κυρίως από τα Th1 T λεμφοκύτταρα όταν αυτά ενεργοποιηθούν από αντιγόνο, και η πρόσδεση της στον υποδοχέα CD25 σηματοδοτεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Μετρήσεις πολλαπλασιασμού των κυττάρων έδειξαν ότι παρουσία της ιντερλευκίνης 2, το V3 πεπτίδιο προκάλεσε ενισχυμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου. Τα αποτελέσματα της εικόνας 3.8A δείχνουν ότι η ιντερλευκίνη 2 προκαλεί συνεχή πολλαπλασιασμό των κυττάρων χωρίς να υπάρχει απότομη ελάττωση, εν αντιθέσει με το προφίλ του πολλαπλασιασμού εξαιτίας του SEA όπου παρατηρήθηκε ενισχυμένη ενεργοποίηση των κυττάρων ακολουθούμενη από απότομη ελάττωση του πολλαπλασιασμού. Σε πειράματα που αφαιρέθηκαν τα CD8 κύτταρα με μαγνητικό διαχωρισμό, ο πολλαπλασιασμός που προκλήθηκε από την παρουσία του V3 ενισχύθηκε, όπως και στην περίπτωση του SEA (Εικ 3.8B). Επίσης, μετρήσεις του ποσοστού αποπτωτικών κυττάρων έδειξαν ότι το V3, παρουσία της IL-2, προκαλεί μεγαλύτερο ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου. Παρόλα αυτά η διαφορά αυτή δεν είναι μεγάλη και τα ποσοστά των αποπτωτικών κυττάρων δεν παρουσιάζουν αύξηση σε συνάρτηση με τις ημέρες όπως συνέβη με τα πειράματα του υπερ-αντιγόνου.

Συμπερασματικά, παρόλο που το σήμα ενεργοποίησης που δίνει η ιντερλευκίνη 2 στα κύτταρα φαίνεται να διατηρεί το V3 φαινόμενο, το μέγεθος του φαινομένου δεν είναι όμοιο με το σήμα της αντιγονοπαρουσίασης. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η ιντερλευκίνη 2 διαδραματίζει κάποιο ρόλο στο μηχανισμό παθογένειας του V3 αλλά παρόλα αυτά είναι απαραίτητα τα ενδοκυτταρικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης για να παρατηρηθεί το V3 φαινόμενο της έντονης ενεργοποίησης που οδηγεί σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο των CD4 κυττάρων.

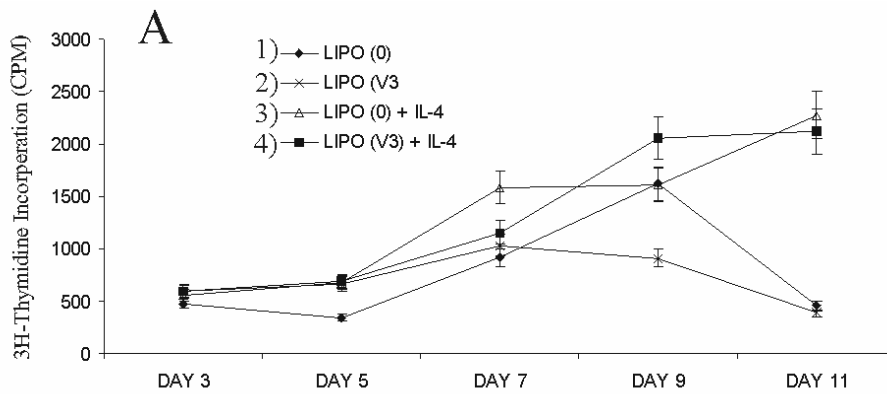


Εικ. 3.8. Μελέτη για την επιρροή της ιντερλευκίνης 2 στο V3 φαινόμενο απουσία του υπεραντιγόνου SEA. A) Μέτρηση πολλαπλασιασμού περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος μετά από μαγνητικό διαχωρισμό όπως μετρήθηκαν με ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στο DNA. B) Κινητική ανάλυση της απόπτωσης στον κυτταρομετρητή ροής χρησιμοποιώντας annexin-V και ιωδιούχο προπύδιο 1) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα χωρίς το V3 πεπτίδιο, 2) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα που φέρουν το V3 πεπτίδιο, 3) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα χωρίς το V3 πεπτίδιο, παρουσία IL-2 και 4) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα που φέρουν το V3 πεπτίδιο, παρουσία IL-2. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από δύο ανεξάρτητα πειράματα σε δύο διαφορετικούς δότες

3.1.6 Μελέτη της επίδρασης της ιντερλευκίνης 4

Η ιντερλευκίνη 4 παράγεται από τους Th2 κυτταρικούς υποπληθυσμούς όταν αυτά ενεργοποιηθούν από κάποιο αντίγονο. Η πρόσδεση της ιντερλευκίνης με τον

αντίστοιχο υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και την διαφοροποίηση των παρθενικών T κυττάρων σε Th2 κύτταρα. Πειραματικές μελέτες όπου πρωτογενή κύτταρα επώαστηκαν με ιντερλευκίνη 4 και λιποσώματα που φέρουν ή όχι το V3 πεπτιδίο χωρίς αντιγονοδιεγερτικό ερέθισμα, έδειξαν ότι το φαινόμενο του V3 δεν διατηρείται. Πιο συγκεκριμένα, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων παρουσία του V3 πεπτιδίου δεν διαφέρει σε σύγκριση με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στις καλλιέργειες ελέγχου (Εικ. 3.9). Το αποτέλεσμα αυτά επιβεβαιώνουν τις αρχικές παρατηρήσεις ότι το V3 φαινόμενο παρατηρείται μόνο στα Th1 κύτταρα.



Εικ. 3.9. Μέτρηση πολλαπλασιασμού περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος μετά από μαγνητικό διαχωρισμό όπως μετρήθηκαν με ενσωμάτωση ραδιενεργού θυμιδίνης στο DNA. 1) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα χωρίς το V3 πεπτιδίο, 2) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα που φέρουν το V3 πεπτιδίο, 3) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα χωρίς το V3 πεπτιδίο, παρουσία IL-4 και 4) Κύτταρα επωασμένα με λιποσώματα που φέρουν το V3 πεπτιδίο, παρουσία IL-4.

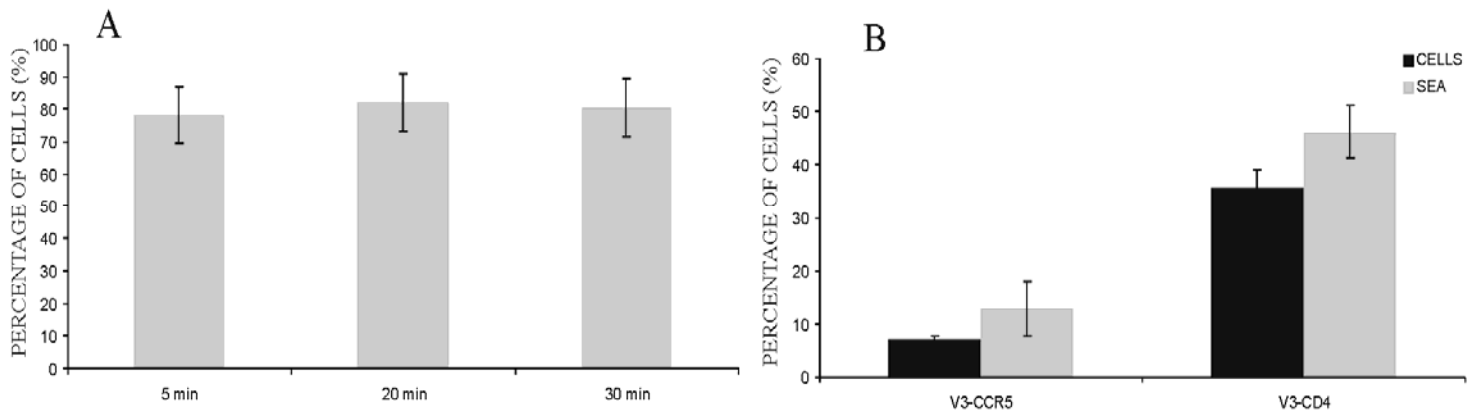
3.2. Μελέτη της αλληλεπίδρασης του V3 πεπτιδίου με τους υποδοχείς των κυττάρων

3.2.1. Εισαγωγή

Παρόλο που οι προηγούμενες μελέτες από την ομάδα μας έχουν δείξει ότι το RANTES, το οποίο είναι ο φυσιολογικός δεσμευτής του υποδοχέα CCR5, εμπόδιζε το V3 φαινόμενο και επίσης μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με SPR (Surface Plasmon Resonance) έδειξαν ότι το V3 πεπτίδιο αλληλεπιδρά με συνθετικά πεπτίδια του αμινοτελικού άκρου του υποδοχέα χημειοκινών CCR5, δεν υπήρχε καμία άμεση παρατήρηση της αλληλεπίδρασης σε κυτταρικό επίπεδο. Επομένως, πραγματοποιήθηκαν μελέτες με V3 συνθετικά πεπτίδια σημασμένα με φθορίζοντα μόρια FLUO (Fluorescein) για να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση του πεπτιδίου τόσο σε πρωτογενή κύτταρα όσο και σε κυτταρικές σειρές.

3.2.2 Αλληλεπίδραση V3 πεπτιδίων με πρωτογενή κύτταρα

Η αλληλεπίδραση του V3 πεπτιδίου με τα κύτταρα είχε δειχθεί έμμεσα σε προηγούμενες μελέτες που περιέγραφαν την επίδραση του V3 στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των T κυττάρων. Με σκοπό να παρατηρήσουμε άμεσα την αλληλεπίδραση των V3 πεπτιδίων με πρωτογενή κύτταρα, έγινε φαινοτυπική ανάλυση σε περιφερικά μονοπύρηνά κύτταρα του αίματος τα οποία επώαστηκαν με V3 συνθετικά πεπτίδια σημασμένα με φθορίζοντα μόρια FLUO. Η ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι το V3 αλληλεπιδρά με όλα τα T κύτταρα (CD3) που αποτελούν περίπου το 80% (Εικ. 3.10 A) των κυττάρων καθώς επίσης και με όλα τα CD4 και CCR5/CD4 κύτταρα (Εικ. 3.10 B) δεδομένου ότι αυτά αποτελούν περίπου το 40% και το 10% των κυττάρων αντίστοιχα. Συνεπώς, το V3 πεπτίδιο φέρεται να αλληλεπιδρά με όλα τα T κύτταρα, τόσο τα CD8 όσο και τα CD4, καθώς επίσης και με το σύνολο των CD4/CCR5 T κύτταρα.

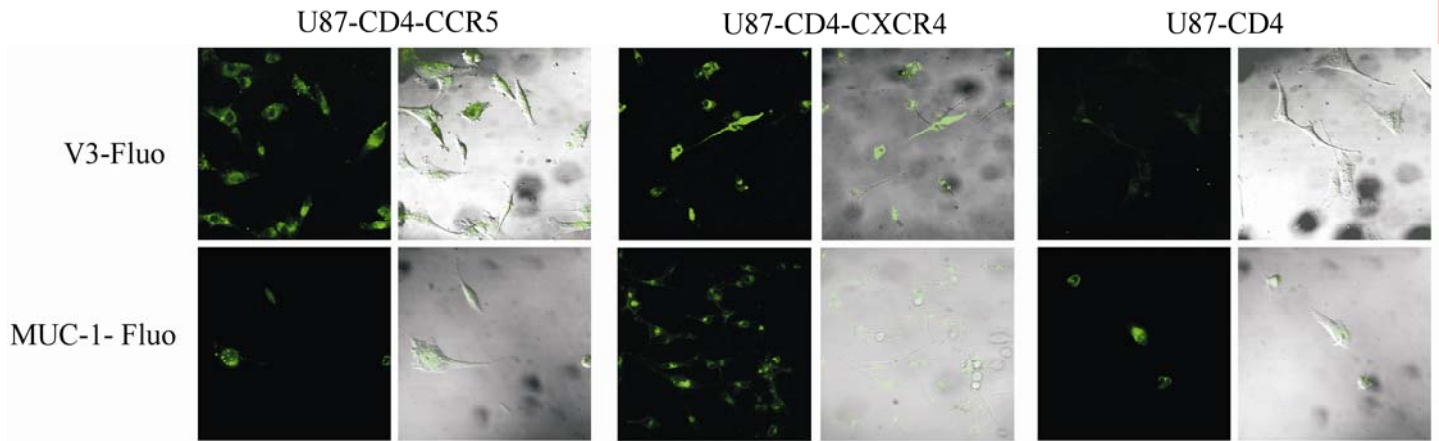


Εικ. 3.10. Φαινοτυπική ανάλυση πρωτογενών κυττάρων επωασμένα με V3-FLUO πεπτίδια. Α) CD3 T κύτταρα σημεισμένα με V3-FLUO πεπτίδια σε διαφορετικούς χρόνους επώασης Β) CD4 και CCR5 T κύτταρα σημεισμένα με V3-FLUO πεπτίδια παρουσία και απουσία υπερ-αντιγόνου SEA. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από δύο ανεξάρτητα πειράματα σε δύο διαφορετικούς δότες.

3.2.3 Αλληλεπίδραση V3 πεπτιδίων με τους υποδοχείς χημειοκινών

Για να επιβεβαιώσουμε την αλληλεπίδραση του V3 πεπτιδίου με τους υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4, χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά πεπτίδια V3-FLUO και MUC-1-FLUO (πεπτίδια έλεγχου). Τα πεπτίδια επώαστηκαν με επιθηλιακά κύτταρα της κυτταρικής σειράς U87 τα οποία ήταν διαμολυσμένα με τον υποδοχέα CD4 (καλλιέργεια ελέγχου), και με κύτταρα διαμολυσμένα με τον υποδοχέα CD4 και τους υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το V3 πεπτίδιο αλληλεπιδρά με κύτταρα διαμολυσμένα με τον CCR5 και τον CXCR4 υποδοχέα αλλά όχι με κύτταρα που είναι διαμολυσμένα με τον CD4 υποδοχέα (Εικ 3.11). Εν αντιθέσει τα MUC-1 πεπτίδια αλληλεπιδρούν με όλες τις κυτταρικές σειρές ανεξαρτήτως επιμόλυνσης και ο φθορισμός τους εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το V3

πεπτιδίο προσδένεται κυρίως με τους υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4, ενώ απουσία των συγκεκριμένων υποδοχέων η πρόσδεση στα κύτταρα είναι περιορισμένη.



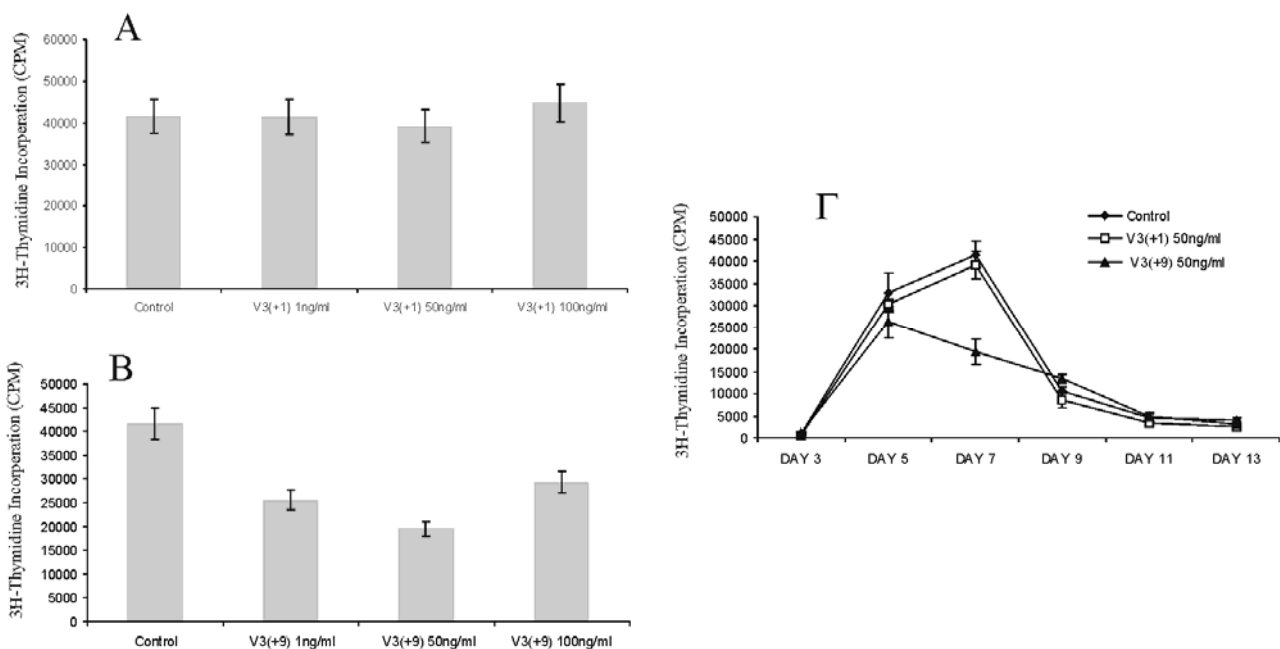
Εικ. 3.11 U87 κύτταρα διαμολυσμένα με τον υποδοχέα CD4 (καλλιέργεια ελέγχου), και με τους υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4, επώαστηκαν με V3 και MUC-1 συνθετικά πεπτιδία σημασμένα με φθορίζοντα μόρια FLUO. Τα κύτταρα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο με την μέθοδο Nomarsky.

3.2.4 Πειράματα αναστολής του V3 φαινομένου

Η αλληλεπίδραση του V3 πεπτιδίου με τον υποδοχέα χημειοκινών CCR5 έχει δηχθεί ότι είναι ιοντικής φύσεως λόγω των θετικά φορτισμένων αμινοξέων του V3 πεπτιδίου και των αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο του CCR5 (Baritaki, Zafiroopoulos et al. 2002; Galanakis, Spyroulias et al. 2005; Morikis, Rizos et al. 2007). Αυτή η ιδιότητα παρουσιάζει τεράστιο βιολογικό ενδιαφέρον αφού είναι θεωρητικά εφικτή η χρήση θετικά και αρνητικά φορτισμένων ουσιών με σκοπό την ανταγωνιστική παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του V3 με τον CCR5 υποδοχέα και επομένως την αναστολή του V3 φαινομένου.

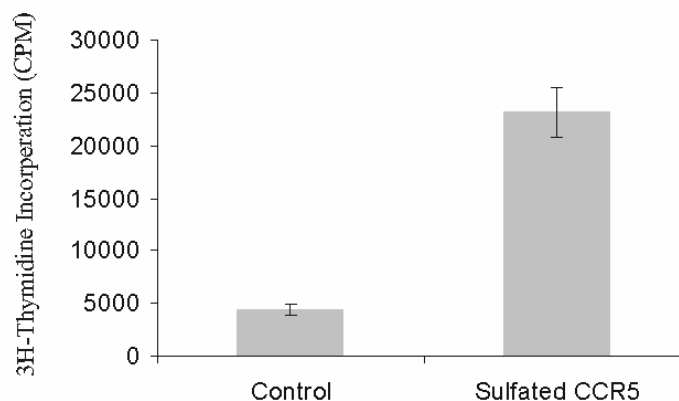
Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά πεπτιδία της V3 περιοχής που φέρουν 1 και 9 θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Τα κύτταρα επωαστήκαν με λιποσώματα που φέρουν η όχι το V3 πεπτιδίο και στην συνέχεια προστέθηκαν η εντεροτοξίνη και τα υδατοδιαλυτά συνθετικά πεπτιδία σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 50 και 100

ng/ml). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα συνθετικά πεπτίδια με 1 θετικό αμινοξύ δεν ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που προκλήθηκε από το V3 σε καμία από τις υπό διερεύνηση συγκεντρώσεις (Εικ. 3.12 Α). Αντιθέτως, τα συνθετικά πεπτίδια με 9 θετικά αμινοξέα ανέστειλαν αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, με την συγκεντρωση των 50 ng/ml να παρουσιάζει την μεγαλύτερη αναστολή (Εικ. 3.12 Β). Τα V3 πεπτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των λιποσωμάτων τα οποία προκαλούν την ενισχυμένη ενεργοποίηση των κυττάρων κατά την προσθήκη του SEA, έχουν 5 θετικά φορτισμένα αμινοξέα. Επομένως, τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στην εικόνα 3.12 Γ, ενισχύουν την παρατήρηση τις ιοντικής αλληλεπίδρασης του V3 με τον υποδοχέα αφού συνθετικά πεπτίδια με 9 θετικά φορτισμένα αμινοξέα αναστέλλουν το φαινόμενο του V3 αποτελεσματικότερα από τα συνθετικά πεπτίδια με 1 θετικό αμινοξύ.



Εικ. 3.12. Πειράματα ανταγωνιστικής αναστολής με συνθετικά πεπτίδια της V3 περιοχής που φέρουν 1 (A) και 9 (B) θετικά φορτισμένα αμινοξέα σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (1, 50 και 100 ng/ml). Γ) Σύγκριση της αναστολής των πεπτιδίων με 1 και 9 θετικά φορτισμένα αμινοξέα στην συγκέντρωση των 50 ng/ml.

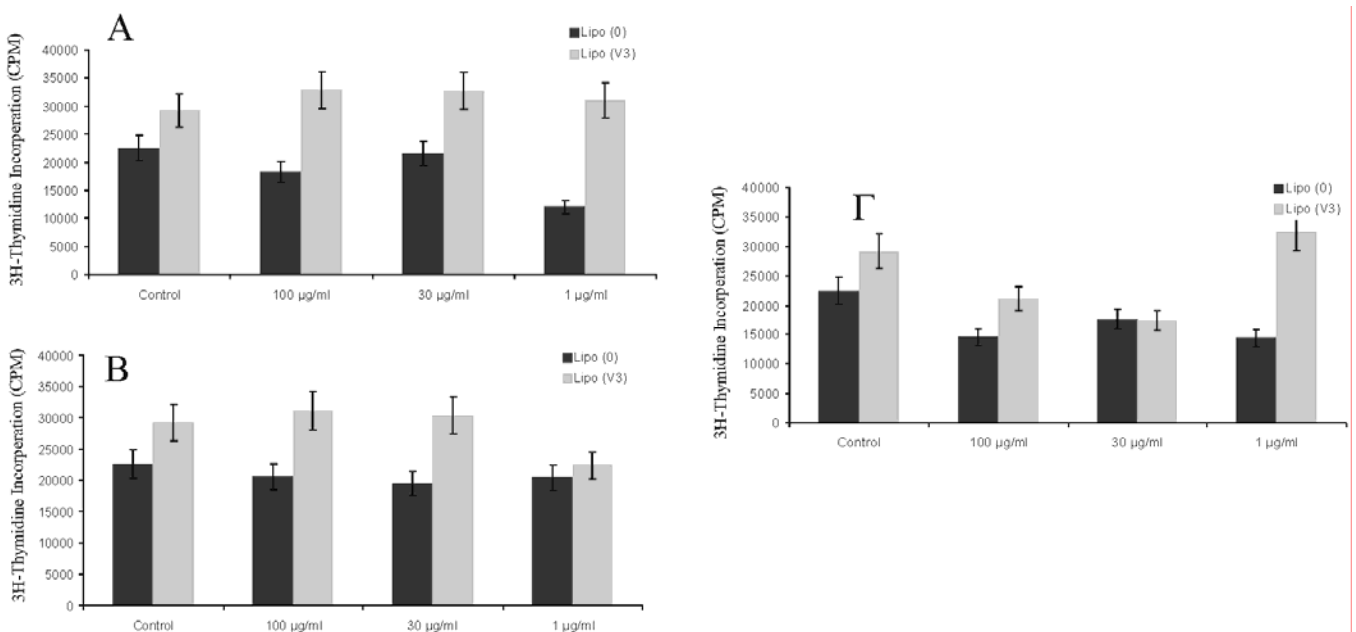
Εκτός από τα θετικά φορτισμένα πεπτίδια, έγιναν πειράματα ανταγωνιστικής αναστολής και με αρνητικά φορτισμένες ουσίες με σκοπό την εκτενέστερη μελέτη του φαινομένου. Σε πρωταρχικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά πεπτίδια του σουλφουρομένου αμινοτελικού άκρου του CCR5. Το θεωρητικό μοντέλο προέβλεπε την αλληλεπίδραση του υδατοδιαλυτού CCR5 συνθετικού πεπτιδίου με το V3 στην επιφάνεια των μακροφάγων και επομένως την ανταγωνιστική παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης του V3 με τους υποδοχείς των T κυττάρων. Τα αποτελέσματα της εικόνας 3.13 δείχνουν ότι τα συνθετικά πεπτίδια του αμινοτελικού άκρου του CCR5 υποδοχέα δεν ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αντιθέτως, παρατηρείτε αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου.



Εικ. 3.13. Πειράματα ανταγωνιστικής αναστολής του φαινομένου του V3 με συνθετικά πεπτίδια σουλφουρομένου αμινοτελικού άκρου του CCR5.

Προκειμένου να μελετήσουμε περαιτέρω την επίδραση αρνητικά φορτισμένων ουσιών στην αναστολή του V3 φαινομένου χρησιμοποιήθηκαν γλυκοζαμινογλυκάνες (GAGs) οι οποίες είναι γραμμικά πολυμερή αποτελούμενα από επαναλαμβανόμενες δισακχαριτικές μονάδες με υψηλό αρνητικό φορτίο. Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η θειική χονδροϊτίνη A (CSA) και B (CSB), και η ηπαράνη σε τρεις διαφορετικές

συγκεντρώσεις (1, 30 και 100mg/ml). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι γλυκοζαμινογλυκάνες που χρησιμοποιήθηκαν δεν ανέστειλαν το φαινόμενο του V3. Αντιθέτως, όπως και στην περίπτωση του σουλφουρομένου CCR5 πεπτιδίου, προκαλούν ενίσχυση του φαινομένου (Εικ. 14). Μερική αναστολή παρατηρείται μόνο στην μικρή συγκέντρωση (1μg/ml) CSB και στην μεσαία συγκέντρωση (30μg/ml) ηπαράνης. Παρόλο που η ηπαρίνη και παράγωγα της έχουν δηχθεί να αλληλεπιδρούν με την γλυκοπρωτεΐνη gp120 του ιού HIV και ειδικότερα με την V3 περιοχή (Roderiquez, Oravec et al. 1995) (Harrop and Rider 1998), στο in vitro σύστημα με τα συνθετικά πεπτίδια V3 δεν φαίνεται να έχει ανασταλτική επίδραση.



Εικ. 3.14. Πειράματα ανταγωνιστικής αναστολής του φαινομένου του V3 χρησιμοποιώντας χονδροϊτίνη A (A) και B (B), και ηπαρίνη (Γ) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (100 μg/ml, 30 μg/ml, 1 μg/ml).

Συνοψίζοντας, με τα παραπάνω πειράματα αποδείχθηκε ότι τα συνθετικά V3 πεπτίδια που χρησιμοποιούνται για της *in vitro* μελέτες αλληλεπιδρούν με όλα τα CD4 και CD4/CCR5 T κύτταρα. Πειράματα με κυτταρικές σειρές στο συνεστιακό μικροσκόπιο έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι κυρίως με τους υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4. Η ιδιαιτερότητα της ιοντικής αλληλεπίδρασης του V3 πεπτιδίου με τους συνυποδοχείς μελετήθηκε εκτενέστερα με σκοπό την ανταγωνιστική αναστολή του V3 φαινομένου. Μια τέτοια προοπτική παρουσιάζει ιδιαίτερο βιολογικό ενδιαφέρον αφού ενδεχόμενη αναστολή της αλληλεπίδρασης έχει σημαντικές προεκτάσεις για την καταπολέμηση της μόλυνσης του ιού HIV-1. Τα πειράματα αναστολής έδειξαν ότι συνθετικά πεπτίδια με 9 θετικά φορτία αναστέλλουν αποτελεσματικά το φαινόμενο του V3 εν αντιθέσει με πεπτίδια που έχουν 1 θετικό φορτίο. Στον αντίποδα συνθετικό πεπτίδιο του αμινοτελικού άκρου του CCR5 και άλλες αρνητικά φορτισμένες ουσίες (θειική χονδροϊτίνη A και B, και ηπαράνη) δεν ανέστειλαν επιτυχώς το φαινόμενο του V3.

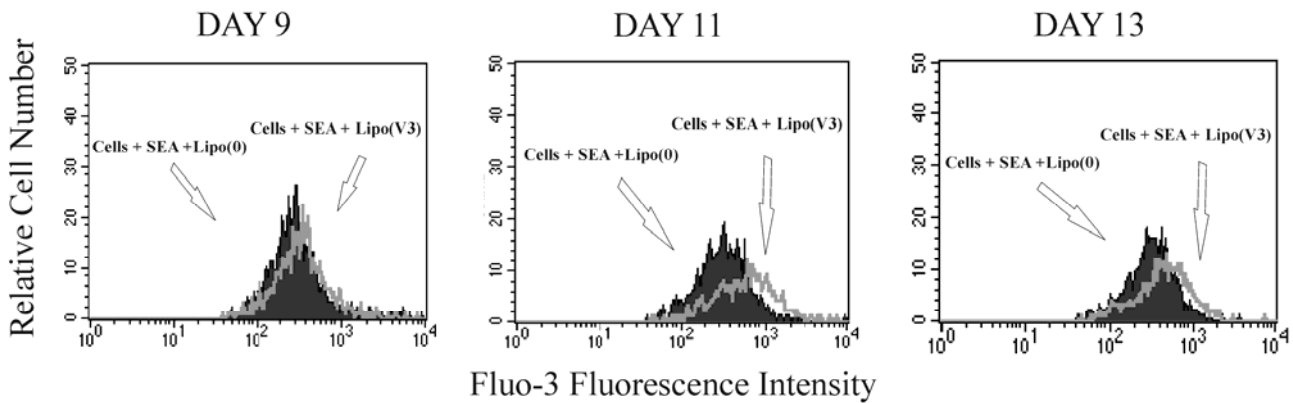
3.3 Μελέτη των ενδοκυτταρικών μονοπατιών του V3 φαινομένου

3.3.1 Εισαγωγή

Η αντικατάσταση του τετανοειδικού *in vitro* μοντέλου από ένα πιο γενικευμένο σήμα ενεργοποίησης των CD4 T κυττάρων που να διατηρεί το φαινόμενο του V3 αποτελούσε ένα σημαντικό μέρος της διδακτορικής διατριβής. Οι πειραματικές μελέτες στα προηγούμενα κεφάλαια τεκμηρίωσαν την συντήρηση του V3 φαινομένου στο γενικευμένο σήμα αντιγονοπαρουσίασης από την εντεροτοξίνη A του σταφυλόκοκκου και συνέβαλαν στην βελτιστοποίηση του φαινομένου με απώτερο στόχο την διερεύνηση των ενδοκυτταρικών μονοπατιών.

3.3.2 Μέτρηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου

Μετρήσεις των επιπέδων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου διενεργήθηκαν χρησιμοποιώντας την χρωστική ουσία FLUO-3AM. Η συγκεκριμένη χρωστική είναι συνδεδεμένη με ένα εστέρα (AM) ο οποίος ευνοεί την είσοδο της μέσα στο κύτταρο όπου γίνεται υδρόλυση του εστέρα από εστεράσες του κυτταροπλάσματος και ελευθερώνεται η χρωστική. Όταν αποπροστατευτεί από τον εστέρα, η χρωστική είναι ελεύθερη να προσδεθεί με ιόντα ασβεστίου, γεγονός που αυξάνει το φθορισμό της και κατά συνέπεια η εκπομπή του FLUO αντιπροσωπεύει τα επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Κινητική ανάλυση με κυτταρομετρία ροής έδειξε ότι το V3 πεπτίδιο προκάλεσε αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου που συνοδεύθηκαν από μείωση στον αριθμό κυττάρων, τις ημέρες 9, 11, και 13 (Εικ. 3.15).



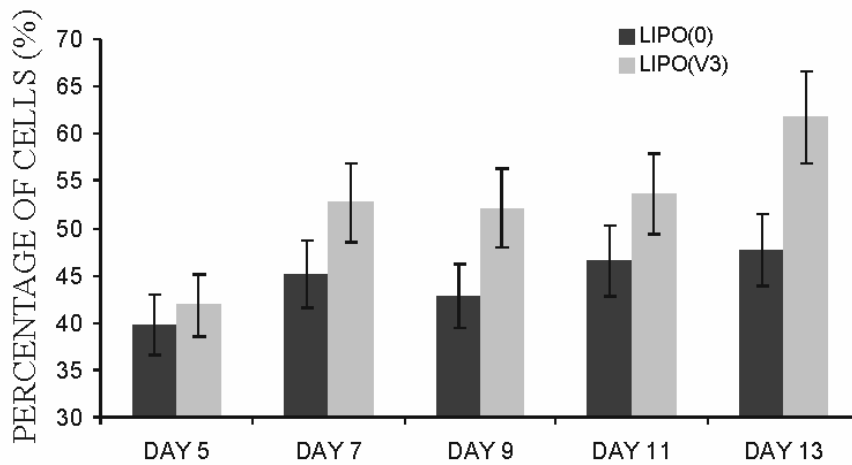
Εικ. 3.15. Επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου ($[Ca^{2+}]_i$) σε περιφερικά μονοπύρηνά κύτταρα του αίματος ύστερα από μαγνητικό διαχωρισμό. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το υπερ-αντιγόνο SEA, παρουσία η όχι του V3 πεπτιδίου και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την χρωστική ουσία FLUO-3AM σε κυτταρομετρητή ροής.

Τα ιόντα ασβεστίου πιστεύεται ότι εμπλέκονται σε πολλές λειτουργίες των T λεμφοκυττάρων όπως η παραγωγή κυτοκινών, ο πολλαπλασιασμός και ο κυτταρικός θάνατος επαγόμενος από ενεργοποίηση (Dolmetsch, Lewis et al. 1997; Mattson and Chan 2003; Schreiber 2005). Η ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης των κυττάρων είναι πολύ εύθραυστη και παρόλο που η αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου απαιτείται για τον πολλαπλασιασμό κυττάρων, η συνεχής αύξηση μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση (Lang, Foller et al. 2005) (Ludanyi, Gogolak et al. 2004). Ως επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας, υπάρχουν συντριπτικά στοιχεία ότι τα T λεμφοκύτταρα μολυσμένων HIV ασθενών παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά κυτταρικού θανάτου επαγόμενο από ενεργοποίηση λόγω της συνεχιζόμενης ενεργοποίησης από τη μόλυνση (Gougeon, Lecoer et al. 1996) (Groux, Torpier et al. 1992) (Oyaizu, McCloskey et al. 1993).

3.3.3 Μέτρηση της επιφανειακής εκφράσεις του FAS υποδοχέα σε περιφερικά κύτταρα

Ο κυτταρικός θάνατος επαγόμενος από ενεργοποίηση αποτελεί ένα φυσιολογικό μηχανισμό απόπτωσης των T κυττάρων και για την επαγωγή του ενοχοποιούνται πολλά κυτταρικά μονοπάτια. Ίσως το πιο κοινά αποδεκτό μονοπάτι είναι αυτό που ξεκινάει από τον υποδοχέα CD95 (Fas) (Alderson, Tough et al. 1995; Dhein, Walczak et al. 1995; Ju, Panka et al. 1995). Ανήκοντας στην μεγάλη οικογένεια των TNF υποδοχέων (Tumor Necrosis Factor), ο Fas υποδοχέας είναι υπεύθυνος για την μεταγωγή ενδοκυτταρικών μηνυμάτων που οδηγούν στον θάνατο των κυττάρων.

Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέα CD95 στην επιφάνεια των CD4/CD45RO T κυττάρων. Η φαινοτυπικές μετρήσεις στον κυτταρομετρητή ροής, έδειξαν ότι το V3 προκαλεί αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν τον συγκεκριμένο υποδοχέα (Εικ. 3.16). Επίσης, παρατηρείτε αύξηση του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα σε συνάρτηση με την χρονική διάρκεια. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της εικόνας 3.6, όπου παρατηρείτε αύξηση του ποσοστού των CD4/CD45RO/CD25 T κυττάρων, και της εικόνας 3.4, όπου παρατηρείτε αύξησης της απόπτωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο. Επομένως, συνδυάζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα, παρατηρούμε ότι το V3 πεπτίδιο προκαλεί αύξηση του ποσοστού των ενεργοποιημένων κυττάρων (CD4/CD45RO/CD25 T κύτταρα), που συνοδεύεται, στις ίδιες χρονικές περιόδους, με αύξηση του ποσοστού των CD4/CD45RO T κυττάρων που φέρουν τον CD95 υποδοχέα. Σε συνδυασμό με τα υψηλά ποσοστά απόπτωσης και τα αυξημένα επίπεδα ενδοκυτταρικού ασβεστίου στις συγκεκριμένες χρονικές περιόδους μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το V3 προκαλεί έντονη ενεργοποίηση των κυττάρων που αυτόματα τα καθιστά ευαίσθητα σε αποπτωτικά σήματα οδηγώντας τα σε κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση.

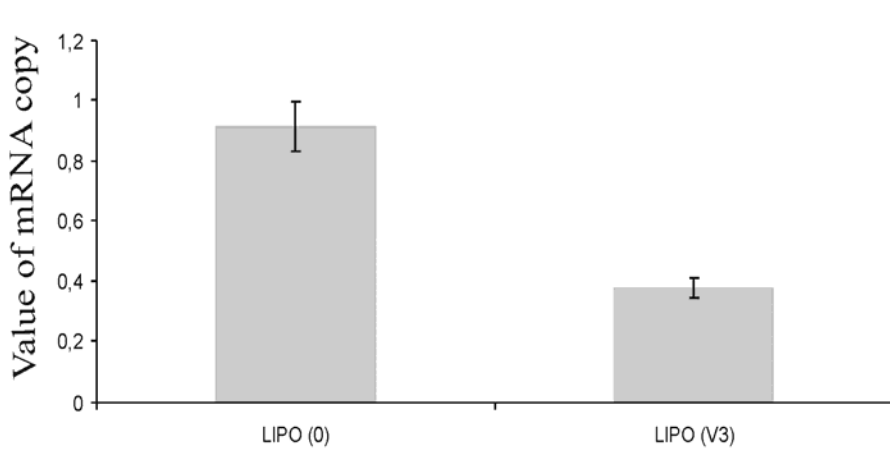


Εικ. 3.16. Κινητική φαινοτυπική ανάλυση του υποδοχέα CD95 (Fas) σε CD4/CD45RO T κύτταρα χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Τα κύτταρα επωάστηκαν με το υπερ-αντιγόνο SEA, παρουσία ή όχι του V3 πεπτιδίου. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από δύο ανεξάρτητα πειράματα σε δύο διαφορετικούς δότες.

3.3.4 Μέτρηση των επιπέδων mRNA του μεταγραφικού παράγοντα Yin Yang 1 (YY1).

Ερευνήσαμε τα επίπεδα mRNA του μεταγραφικού παράγοντα Yin-Yang 1 (YY1) που φέρεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυογένεση, τη διαφοροποίηση, και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Gordon, Akopyan et al. 2006). Αυτός ο πολύλειτουργικός μεταγραφικός παράγοντας ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων που εμπλέκονται στα μονοπάτια ενεργοποίησης και απόπτωσης. Πιο συγκεκριμένα, μεταξύ των άλλων, ο YY1 βρέθηκε να ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του υποδοχέα χημειοκινών CCR5 καθώς επίσης και την έκφραση του αποπτωτικού υποδοχέα CD95 (Garban and Bonavida 2001; Moriuchi and Moriuchi 2003). Δεδομένου ότι παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των υποδοχέων CCR5 και FAS, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση του mRNA του YY-1 με σκοπό να διερευνηθεί ενδεχόμενη μείωση του. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν αυτή την υπόθεση, δεδομένου

ότι το V3 προκάλεσε μείωση των επιπέδων mRNA του YY1 περίπου -2,4 φορές σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου (Εικ. 3.17). Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι υποδοχείς CCR5 και FAS εμπλέκονται στη ενεργοποίηση και την απόπτωση των κυττάρων υποθέτουμε ότι ο YY1 μπορεί ενδεχομένως να διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στον κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση δεδομένου ότι μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση πρωτεϊνών που περιλαμβάνονται και στα δύο μονοπάτια.



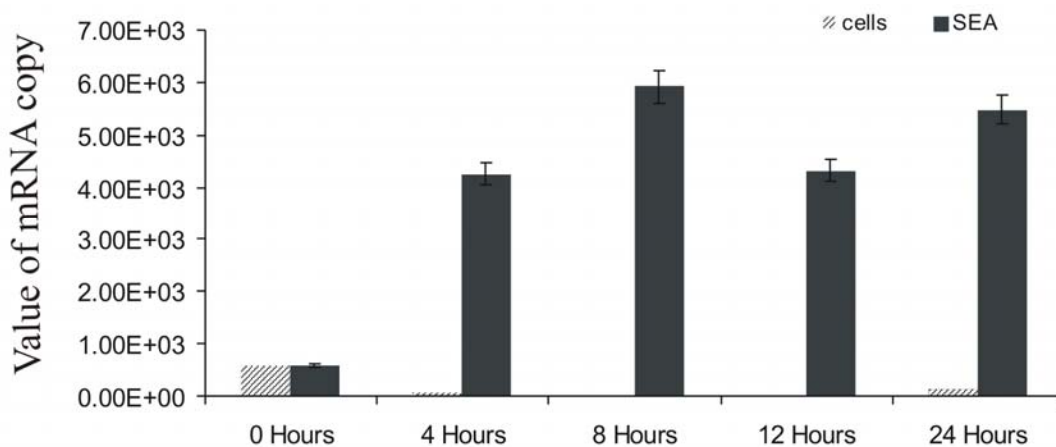
Εικ. 3.17. Μέτρηση των επιπέδων mRNA του μεταγραφικού παράγοντα YY1 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (q RT-PCR). Τα κύτταρα επωάστηκαν με το υπερ-αντιγόνο SEA, παρουσία ή όχι του V3 πεπτιδίου. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το GAPDH. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

3.3.5 Μετρήσεις των επιπέδων mRNA της ιντερλευκίνης 2

Πρωταρχικός στόχος της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής ήταν η αντικατάσταση του τετανοειδικού μοντέλου με απώτερο σκοπό την μελέτη των ενδοκυτταρικών μονοπατιών. Μετά από μελέτες βελτιστοποίησης του V3 φαινομένου καταλήξαμε στην χρήση του υπερ-αντιγόνου SEA το οποίο διευκολύνει την μελέτη των ενδοκυτταρικών μονοπατιών επειδή ενεργοποιεί μεγαλύτερο αριθμό T λεμφοκυττάρων. Επομένως, για να μελετήσουμε τα σήματα που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο

επαγόμενο από ενεργοποίηση πραγματοποιήθηκαν μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA (cDNA).

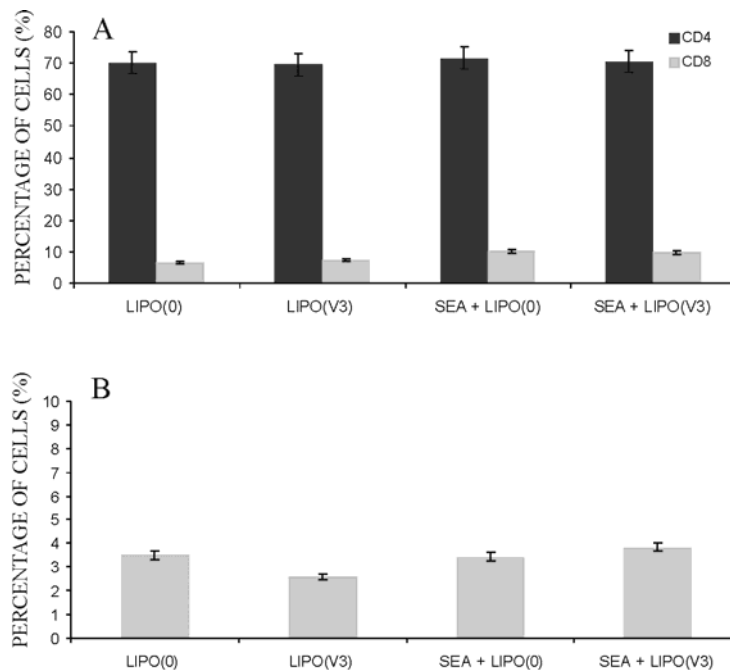
Για να εντοπίσουμε το ακριβές χρονικό σημείο εκχύλισης του RNA το οποίο χρησιμοποιείτε για περαιτέρω την ανάλυση με τις μικροσυστοιχίες, πραγματοποιήθηκε κινητική ανάλυση των επιπέδων mRNA της ιντερλευκίνης 2 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε πρωτογενή περιφερικά κύτταρα που επώαστηκαν με ή χωρίς SEA. Η μεταγραφή του γονιδίου της IL-2 αποτελεί το τελικό στάδιο του σηματοδοτικού μονοπατιού της αντιγονοπαρουσίασης. Τα αποτελέσματα της κινητικής ανάλυσης έδειξαν ότι τα επίπεδα του mRNA αυξάνονται μόλις 4 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων με SEA και το μέγιστο επίπεδο παρατηρήθηκε στις 8 ώρες (Εικ. 3.18). Έχοντας ως απώτερο σκοπό να μελετήσουμε τα πρωταρχικά σήματα που προκαλούν την έντονη ενεργοποίηση των κυττάρων επιλέξαμε ως βέλτιστο χρονικό σημείο για τις μικροσυστοιχίες τις 8 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων με SEA.



Εικ. 3.18 Κινητική ανάλυση των επιπέδων mRNA της IL-2 με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (q RT-PCR) σε περιφερικά μονοπύρηνά κύτταρα του αίματος μετά από μαγνητικό διαχωρισμό, επωασμένα με του υπερ-αντιγόνο SEA. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το GAPDH. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

3.3.6 Φαινοτυπική ανάλυση των CD4/CD45RO κυττάρων 8 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων με το υπερ-αντιγόνο

Για την πληρέστερη μελέτη του φαινομένου την χρονική στιγμή της εκχύλισης του mRNA πραγματοποιήθηκε φαινοτυπική ανάλυση για να διερευνηθούν τα επίπεδα των CD4 των CD8 T κυττάρων καθώς επίσης και τα ποσοστά των CD4/CD45RO/CCR5 T κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα CD4 T κύτταρα αποτελούν περίπου το 80% των κυττάρων ενώ τα CD8 αποτελούν το 10% (Εικ. 3.19 Α). Τα τριπλοθετικά CD4/CD45RO/CCR5 T κύτταρα αποτελούν περίπου το 2% των συνολικών λεμφοκυττάρων (Εικ. 3.19 Β). Από τα αποτελέσματα της εικόνας 19 φαίνεται ότι η παρουσία του υπερ-αντιγόνου δεν έχει μεταβάλει τα ποσοστά των κυττάρων, γεγονός που αποδίδεται στο ότι τα κύτταρα δεν έχουν αρχίσει να πολλαπλασιάζονται και βρίσκονται ακόμα υπό την σηματοδότηση του SEA.

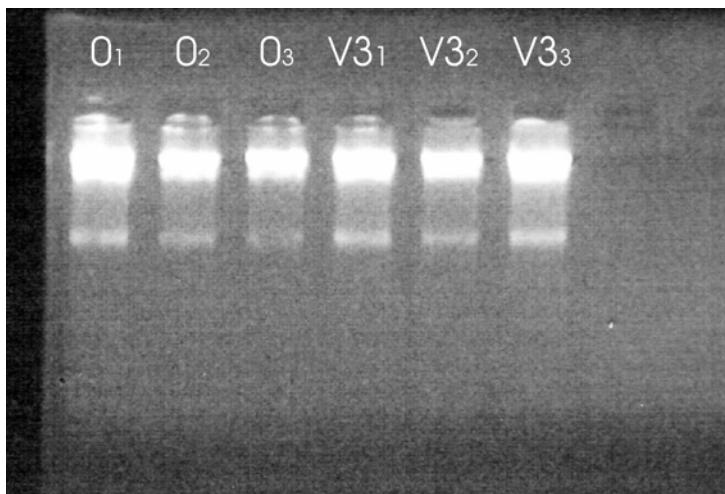


Εικ 3.19. Α) Φαινοτυπική ανάλυση των CD4 και CD8 κυττάρων σε περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMC) και μετά από μαγνητικό διαχωρισμό (MACS). Β) Φαινοτυπική ανάλυση του CD4/CD45RO/CCR5 υποπληθισμού των T

κυττάρων χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 8 ώρες μετά την προσθήκη του υπερ-αντιγόνου.

3.3.7 Μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της εικόνας 3.18, η εκχύλιση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε 8 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων με SEA με το κιτ RNeasy (QIAGEN). Για την καλύτερη εκτέλεση των μικροσυστοιχειών και για πληρέστερη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε εκχύλιση από 6 διαφορετικά βιολογικά δείγματα για κάθε περίπτωση (κύτταρα που επωάστηκαν με SEA και με λιποσώματα που είχαν ή όχι το V3 πεπτίδιο) του ίδιου δότη. Από αυτά επιλέχθηκαν 3 ζευγάρια (κύτταρα έλεγχου και κατεργασμένα) τα οποία παρουσίασαν την μεγαλύτερη ποσότητα σε RNA και υψηλότερη καθαρότητα (ο λόγος 260/280 ήταν κοντά στο 2). Τα δείγματα αξιολογήθηκαν περαιτέρω με ηλεκτροφόρηση σε 2% πήκτωμα αγαρόζης για την καλύτερη μελέτη της ακεραιότητας του RNA. Η εικόνα 3.20 δείχνει ότι και τα 6 δείγματα που επιλέχθηκαν είναι ακέραια και δεν έχουν υποστεί αποικοδόμηση από αρενάσες.



Εικ. 3.20. Ανάλυση των δειγμάτων RNA με ηλεκτροφόρηση σε 2 % πήκτωμα αγαρόζης.

Εφόσον διαπιστώθηκε η ακεραιότητα του RNA, τα δείγματα εστάλησαν στην εταιρία Agos Applied Biotechnology (Denmark) όπου πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία και η πρωταρχική ανάλυση των μικροσυστοιχιών. Οι πλατφόρμες που χρησιμοποιήθηκαν για τις μικροσυστοιχίες ήταν της εταιρίας Affymetrix (Human Genome U133 Plus 2.0 Array) και περιείχαν πάνω από 47.000 μετάγραφα συμπεριλαμβανομένου και 38,500 γονιδίων του ανθρώπινου γονιδιώματος. Με τις συγκεκριμένες πλατφόρμες δύναται να παρατηρήσουμε αλλαγές στην έκφραση του συνόλου του ανθρώπινου γονιδιώματος και επομένως γίνεται εφικτή η μελέτη των πρωταρχικών σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στο βιολογικό φαινόμενο που προκαλεί το V3 πεπτίδιο.

Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων ανέδειξε 378 γονίδια (με $p \leq 0.05$) των οποίων τα επίπεδα mRNA ήταν αυξημένα περισσότερο από 2 φορές και 61 γονίδια (με $p \leq 0.05$) των οποίων τα επίπεδα ήταν μειωμένα περισσότερο από 2 φορές σε σύγκριση με τις καλλιέργειες έλεγχου. Περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι από τα γονίδια στα οποία παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA, 50 γονίδια σχετίζονται με τον μεταβολισμό, 34 με τον κυτταρικό κύκλο, 65 με την μεταγραφή, 24 με την μεταγωγή σήματος, 16 με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και 13 με την απόπτωση των κυττάρων. Αρκετά από τα γονίδια αυτά συμμετέχουν σε παραπάνω από ένα βιολογικό μονοπάτι, γεγονός που καθίστα την μελέτη τους πιο σύνθετη (Πιν. 3.1). Ένα πρώτο συμπέρασμα είναι ότι η πλειοψηφία των γονιδίων συμμετέχει σε λειτουργίες που συμβάλουν στην ενεργοποίηση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Στον πίνακα 3.2 φαίνονται μερικά γονίδια τα οποία επιλέχτηκαν έχοντας ως βασικό κριτήριο τον βιολογικό ρόλο σε συνάρτηση με τα επίπεδα του mRNA. Η πλειοψηφία των γονιδίων σχετίζεται με ενεργοποίηση των κυττάρων και την αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Από τα συγκεκριμένα γονίδια το NFAT 5 (nuclear factor of activated T-cells 5) παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον αφού η πρωτεΐνη που εκφράζεται είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που σχετίζεται με την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν συγκεκριμένα γονίδια που σχετίζονται με την αύξηση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και τα μονοπάτια που ακολουθούν. Το CD38 είναι ένας μεμβρανικός υποδοχέας που προκαλεί

αύξηση των επιπέδων ασβεστίου ενώ το IPTR2 είναι ο υποδοχέας του ενδοπλασματικού δικτύου που σχετίζεται με την απελευθέρωση των ιόντων ασβεστίου που βρίσκονται αποθηκευμένα μέσα στο δίκτυο (Hernandez, Leite et al. 2007) (Endo, Harada et al. 2006). Επίσης τα γονίδια CAMKK2, CAMK1D, CAMK2D, και ITPKB σχετίζονται με μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την αύξηση των επιπέδων ιόντων ασβεστίου και οδηγούν στην ενεργοποίηση του κυττάρου (Woods, Dickerson et al. 2005) (Mishra, Mishra et al. 2005; Mishra, Mishra et al. 2005) (Dewaste, Moreau et al. 2003).

Πίνακας 3.1. Διαχωρισμός των γονιδίων, με αυξημένα επίπεδα mRNA στις μικροσυστοιχίες, ανάλογα με τα βιολογικά μονοπάτια που συμμετέχουν

Αριθμός Μονοπατιών	Μονοπάτια που συμμετέχουν τα γονίδια				Συνολικά
	1	2	3	≥4	
Δομή	5	2	0	0	7
Μεταβολισμός	44	5	0	1	50
Επιδιόρθωση του DNA	3	4	1	0	8
Κυτταρικός Κύκλος	25	6	3	0	34
Μεταγραφή	54	7	3	1	65
Μεταγωγή Σήματος	13	7	1	2	23
Κυτταρικός Πολλαπλασιασμός	5	6	2	3	16
Απόπτωση	4	5	1	3	13
Ανοσολογική Απάντηση	2	3	0	3	8
T Κύτταρα	0	3	0	2	5
Ασβέστια	1	4	0	0	5
Υπόλοιπα	160	7	0	0	167

Πίνακας 3.2. Επιλεγμένα γονίδια με μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον για το φαινόμενο του V3. Τα γονίδια προέκυψαν ύστερα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών και παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα mRNA σε σχέση με της καλλιέργειες ελέγχου και $p \leq 0.05$.

Gene name	Gene Description	Fold Change	Affymetrix ID
NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	17,9	208003_s_at
NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	4,11	215092_s_at
CD38	CD38 molecule	2,21	205692_s_at
TP53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome	2,34	224185_at
KPNA1	karyopherin alpha 1 (importin alpha 5)	2,21	202057_at
ITPR2	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2	3,12	216614_at
ITPKB	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	2,49	232499_at
CAMK2D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta	2,14	224994_at
CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	2,25	213812_s_at
CAMK1D	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	2,26	235626_at
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)	7,15	212249_at
CDC20	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	4,05	202870_s_at
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	2,64	204015_s_at
DUSP4	dual specificity phosphatase 4	4,44	204014_at
API5	apoptosis inhibitor 5	2,94	233078_at
PAK1	p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast)	4,13	230100_x_at
BIRC4BP	XIAP associated factor-1	8,21	242234_at
TNFSF7	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	2,12	206508_at
IRF7	interferon regulatory factor 7	2,29	208436_s_at
CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	7,47	210163_at

Από τα 61 συνολικά γονίδια των οποίων τα επίπεδα mRNA παρουσίασαν ελάττωση περισσότερο από 2 φορές σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου, 10 γονίδια σχετίζονται με τον μεταβολισμό των κυττάρων, 4 με τον κυτταρικό κύκλο, 9 με την μεταγωγή σήματος, 2 με την απόπτωση και 4 με την ανοσολογική απάντηση (Πιν. 3.3). Τα γονίδια με το μεγαλύτερο βιολογικό ενδιαφέρον, όσων αφορά το V3 φαινόμενο, απεικονίζονται στον πίνακα 3.4. Από τα συγκεκριμένα γονίδια, το BCL-2 παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον αφού μια από τις βιολογικές του λειτουργίες είναι να μπλοκάρει την δράση του p53 (Jiang and Milner 2003). Επομένως, μείωση των επιπέδων του mRNA του BCL-2 σε συνάρτηση με την αύξηση των επιπέδων mRNA του TP53 (Πιν. 3.2) ενοχοποιούν το συγκεκριμένο γονίδιο που φέρεται να έχει σημαντικό ρόλο στην απόπτωση των κυττάρων που προκαλεί το V3 φαινόμενο.

Πίνακας 3.3. Διαχωρισμός των γονιδίων, με μειωμένα επίπεδα mRNA στις μικροσυστοιχίες, ανάλογα με τα βιολογικά μονοπάτια που συμμετέχουν

Αριθμός Μονοπατιών	Μονοπάτια που συμμετέχουν τα γονίδια				Συνολικά
	1	2	3	≥4	
Μεταβολισμός	9	1	0	0	10
Κυτταρικός Κύκλος	2	1	1	0	4
Μεταγραφή	2	0	1	0	3
Μεταγωγή Σήματος	7	1	1	0	9
Απόπτωση	0	2	0	0	2
Ανοσολογική Απάντηση	3	1	0	0	4
Υπόλοιπα	29	0	0	0	29

Πίνακας 3.4. Επιλεγμένα γονίδια με μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον για το φαινόμενο του V3. Τα γονίδια προέκυψαν ύστερα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών και παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα mRNA σε σχέση με της καλλιέργειες ελέγχου και $p \leq 0.05$.

Gene name	Gene Description	Fold Change	Affymetrix ID
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	-2,17	207004_at
TLR5	toll-like receptor 5	-2,159	210166_at
LILRB1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1	-2,176	213975_s_at
HLA-DOA	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	-2	211142_x_at
PRKAR1 B	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta	-5,61	212555_at
PTPLA	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member A	-7,358	1554376_s_at
EPOR	erythropoietin receptor	-2,4	396_f_at
PPP2R5B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), beta isoform	-2,314	635_s_at
RAB32	RAB32, member RAS oncogene family	-2,08	204214_s_at
RAB2	RAB2, member RAS oncogene family	-2,28	208730_x_at
PPBP	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	-2,26	214146_s_at

Η πειραματική διαδικασία των μικροσυστοιχιών ήταν σχεδιασμένη έτσι ώστε να αναλυθούν 3 δείγματα από κάθε περίπτωση. Με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το pair T-test, και τα δείγματα με $p \leq 0.005$ θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικά και αναλύθηκαν περαιτέρω. Παρόλα αυτά μια τυχαία διακύμανση σε 1 από τα 3 δείγματα αλλοιώνει την στατιστική ανάλυση και τα αποτελέσματα παρουσιάζουν πιθανότητα μεγαλύτερη από 0.05. Για αυτό τον

λόγο πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε γονίδια στα οποία η στατιστική πιθανότητα ξεπερνάει ελαφρώς αυτό το όριο (εως 0.08) και παρουσιάζουν μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον για το φαινόμενο του V3. Τα συγκεκριμένα γονίδια παρουσιάζονται στον πίνακα 3.5 και αποτελούν γονίδια τα οποία εμπλέκονται κυρίως σε σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν γονίδια όπως το Kras, το PIK3R1 και το MAP3K8 τα οποία κωδικοποιούν ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του TCR. Τέλος το NFAT2IP αποτελεί μέλος της οικογένειας των NFAT, όπως και το NFAT5, και με κύρια λειτουργία την ενεργοποίηση του από το σηματοδοτικό μονοπάτι του TCR και ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που οδηγούν στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων.

Πίνακας 3.5. Επιλεγμένα γονίδια με μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον για το φαινόμενο του V3. Τα γονίδια προέκυψαν ύστερα από την ανάλυση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών και παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα mRNA σε σχέση με της καλλιέργειες ελέγχου και $p \geq 0.05$

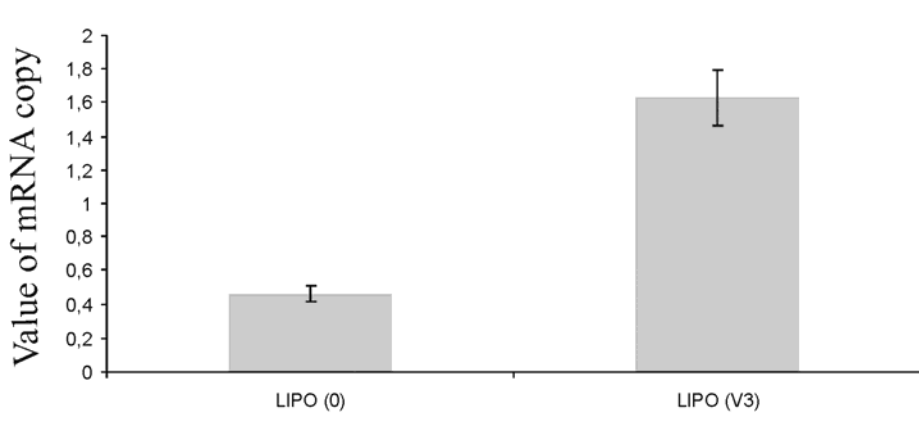
Gene name	Gene Description	Fold Change	Affymetrix ID
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	3,22	214352_s_at
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)	2,62	212240_s_at
MAP3K8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 l delta	3,40	235421_at
NFATC2IP	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 interacting protein	4,06	238130_at
IL7	interleukin 7	2,88	206693_at
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	8,74	239798_at
CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	2,38	205467_at
PAK1	p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast)	4,13	230100_x_at
CDC42	Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	2,96	1556931_at

3.3.8 Μετρήσεις των επιπέδων mRNA του μεταγραφικού παράγοντα NFAT5

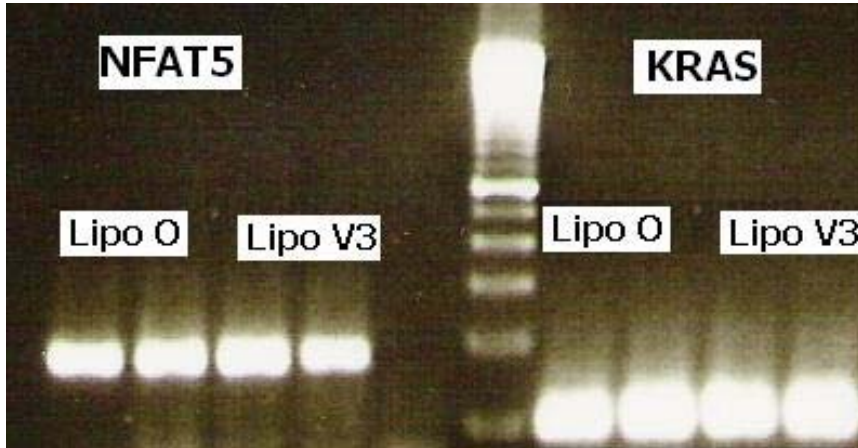
Τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών έδωσαν χρήσιμες πληροφορίες βάση των οποίων γίνεται εφικτή η αναζήτηση και ολοκλήρωση όλων των κομματιών που συμπληρώνουν το πάζλ του βιολογικού φαινομένου του V3 κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης. Μελετώντας τα γονίδια και αναλύοντας εκτενεστέρα την επιρροή τους στον παρατηρούμενο κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση μπορούμε πλέον να ανακαλύψουμε συγκεκριμένα μονοπάτια της παθογένειας του HIV με απώτερο στόχο να επιχειρηθεί η αναστολή του φαινομένου.

Ένα πρώτο βήμα για την επίτευξη αυτού του στόχου είναι η διασταύρωση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών. Ύστερα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν συγκεκριμένα γονίδια για περαιτέρω ανάλυση τα οποία παρουσιάζουν έντονο βιολογικό ενδιαφέρον. Το γονίδιο NFAT5 (nuclear factor of activated T-cells 5) πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην έντονη ενεργοποίηση των κυττάρων που προκαλεί V3 πεπτίδιο και αποτελεί το βασικό γονίδιο για την εκτενέστερη μελέτη των ενδοκυτταρικών σημάτων. Η πρωτεΐνη NFAT5 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των REL πρωτεϊνών, η οποία αποτελείται από τις NF-kB και NFATc πρωτεΐνες (Lopez-Rodriguez, Aramburu et al. 1999) (Miyakawa, Woo et al. 1999). Παρόλο που η περιοχή πρόσδεσης με το DNA πιστεύεται ότι έχει εξελιχτεί από τον NF-kB και οι λειτουργικές ιδιότητες είναι παρόμοιες με τις NF-kB και NFATc πρωτεΐνες, η υπόλοιπη δομή της πρωτεΐνης είναι τελείως διαφορετική από τις λοιπές πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας (Aramburu, Drews-Elger et al. 2006) (Lopez-Rodriguez, Aramburu et al. 2001). Οι λειτουργικές ιδιότητες του μεταγραφικού παράγοντα έχουν μελετηθεί κυρίως κατά την διάρκεια του οσμωτικού στρες (Lee, Colla et al. 2003) (Dahl, Handler et al. 2001) (Tong, Guo et al. 2006). Παρόλα αυτά η βιολογική του δράση έχει αποδειχθεί και ανεξαρτήτως οσμωτικού στρες, όπως στην ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων από παρατεταμένο σήμα κατά την αντιγονοπαρουσίαση (Trama, Lu et al. 2000).

Η διασταύρωση των αποτελεσμάτων για τον NFAT5 πραγματοποιήθηκε με ημιποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (q RT-PCR) σε διαφορετικά δείγματα από αυτά που πραγματοποιήθηκαν οι μικροσυστοιχίες. Για τον σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν εκκινητές που να προσδένονται και στα 5 μετάγραφα του γονιδίου, ενώ ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το GAPDH. Ύστερα από την ανάλυση των δεδομένων και την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με τον γονίδιο αναφοράς, επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών αφού διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA του NFAT5. Πιο συγκεκριμένα το mRNA του γονιδίου στα κύτταρα που είχαν επωαστεί με το V3 ήταν 3,7 φορές πιο αυξημένο σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου (Εικ. 3.21). Η ανάλυση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε 2% πήκτωμα αγαρόζης έδειξε ότι στην αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης δεν υπήρχαν παραπροϊόντα (Εικ. 3.22). Τελειώνοντας, πρέπει να επισημανθεί ότι οι μικροσυστοιχίες δεν έχουν υψηλή ειδικότητα και για αυτό το λόγο απαιτείται η διασταύρωση των αποτελεσμάτων με μία πιο ειδική μέθοδο με μεγαλύτερη ευαισθησία. Έτσι εξηγείται και το γεγονός ότι οι μικροσυστοιχίες έδειξαν 17 φορές μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων mRNA, ενώ με την RT-PCR μόνο 3,7 φορές.



Εικ. 3.21. Μέτρηση των επιπέδων mRNA του μεταγραφικού παράγοντα NFAT5 (nuclear factor of activated T-cells 5) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (q RT-PCR). Τα κύτταρα επώαστηκαν με το υπερ-αντιγόνο SEA, παρουσία ή όχι του V3 πεπτιδίου. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το GAPDH. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

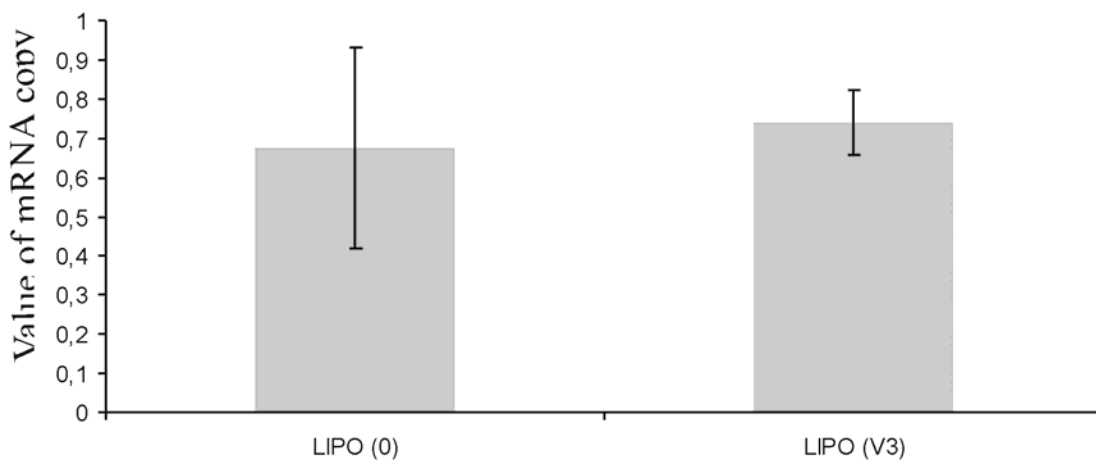


Εικ. 3.22. Ανάλυση προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (q RT-PCR) για το NFAT5 και το KRAS ύστερα από ηλεκτροφόρηση σε 2% πήκτωμα αγαρόζης.

3.3.9 Μετρήσεις των επιπέδων mRNA του Kras

Επόμενο βήμα για την επιβεβαίωση των μικροσυστοιχιών ήταν η διασταύρωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου Kras. Το Kras ανήκει την οικογένεια των RAS ογκογονιδίων και η εκφραζόμενη πρωτεΐνη συναντάται κυρίως κοντά στην μεμβράνη των κυττάρων. Κύριο χαρακτηριστικό της είναι η πρόσδεση σε GDP και GTP όπου καθορίζει και την κατάσταση απενεργοποίησης και ενεργοποίησης της πρωτεΐνης αντίστοιχα. Όταν προσδέεται σε GTP η πρωτεΐνη ενεργοποιείται και δρα ως υπόστρωμα για την ενεργοποίηση άλλων πρωτεϊνών όπως η PI3-K (Phosphoinositide 3V-kinase) και η Raf (ras activated protein), ξεκινώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν στην ενεργοποίηση των κυττάρων (Kranenburg 2005) (Friday and Adjei 2005) (Roose and Weiss 2000). Τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών έδειξαν αύξηση των επιπέδων mRNA σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου αλλά η στατιστική

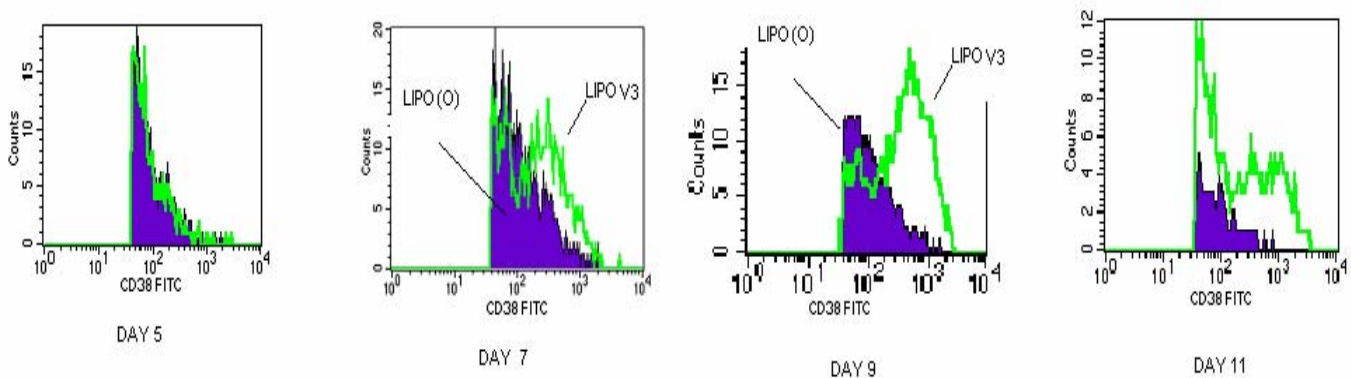
επεξεργασία έδειξε πιθανότητα μεγαλύτερη από 0.05. Παρόλα αυτά λόγω τις μεγάλης βιολογική σημασίας του συγκεκριμένου γονιδίου πραγματοποιήθηκε περαιτέρω μελέτη με RT-PCR. Ύστερα από κανονικοποίηση των δεδομένων με το γονίδιο αναφοράς (GAPDH) τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν παρατηρείτε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου σε σύγκριση με τις καλλιέργειες ελέγχου (Εικ 3.23). Η ανάλυση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση σε 2% πήκτωμα αγαρόζης έδειξε ότι στην αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης δεν υπήρχαν παραπροϊόντα (Εικ. 3.22). Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε η επιθυμητή αύξηση του mRNA τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών αφού η στατιστική ανάλυση που έδειχνε πιθανότητα μεγαλύτερη από 0.05 και επομένως υποδείκνυε αναξιοπιστία της παρατηρούμενης αύξησης, επαληθεύτηκε.



Εικ. 3.23. Μέτρηση των επιπέδων mRNA K-Ras με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (q RT-PCR). Τα κύτταρα επώαστηκαν με το υπερ-αντιγόνο SEA, παρουσία ή όχι του V3 πεπτιδίου. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς το GAPDH. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (\pm SD) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

3.3.10 Μελέτη της έκφρασης του CD38 υποδοχέα

Το CD38 είναι ένας πολυλειτουργικός υποδοχέας που βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη των B και T λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων, των πλασμοκυττάρων των ευθροκυττάρων και άλλων (Mehta, Shahid et al. 1996; Fernandez, Deaglio et al. 1998; De Flora, Zocchi et al. 2004). Λειτουργικά, είναι ένα εξωένζυμο που μετατρέπει το NAD⁺ σε κυκλικό ADP-ριβόζη (cADPr) και η μετατροπή αυτή σηματοδοτεί ένα καταρράκτη ο οποίος οδηγεί σε απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο κυτταρόπλασμα (Howard, Grimaldi et al. 1993; Franco, Guida et al. 1998). Πιο συγκεκριμένα, στα T λεμφοκύτταρα έχει δειχτεί ότι εμπλέκεται στην ενεργοποίηση και των πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην έκκριση κυτοκινών, σε υπερέκφραση των CD95 και CD28 μορίων καθώς και στην απόπτωση των κυττάρων (Alessio, Roggero et al. 1990; Funaro, Spagnoli et al. 1990; Ausiello, la Sala et al. 1996; Morra, Zubiaur et al. 1998).



Εικ. 3.24. Ανάλυση της έκφρασης του CD38 υποδοχέα στα CD4/CD45RO T κύτταρα. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το υπερ-αντιγόνο SEA, παρουσία ή όχι του V3 πεπτιδίου και η μέτρηση πραγματοποιήθηκε σε κυτταρομετρητή ροής.

Η ανάλυση των μικροσυστοιχιών έδειξε αύξηση των επιπέδων του mRNA του γονιδίου του CD38, 2,2 φορές περισσότερο από τις καλλιέργειες ελέγχου. Για να διαπιστωθεί εάν αυτή η αύξηση στα επίπεδα mRNA συνοδεύεται από αύξηση και στα επίπεδα της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε κινητική φαινοτυπική ανάλυση των CD4/CD45RO T κυττάρων με κυτταρομετρία ροής. Τα αποτελέσματα πιστοποίησαν τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών αφού το V3 πεπτίδιο προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του υποδοχέα CD38 στα ενεργοποιημένα CD4/CD45RO T κύτταρα (Εικ 3.24). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι χρονικές περίοδοι που παρατηρείται η αύξηση του υποδοχέα καθώς στις ίδιες χρονικές στιγμές παρατηρήθηκε αύξηση των ενδοκυτταρικών ασβεστίων, του υποδοχέα CD95 και της απόπτωσης.

4.Συζήτηση

4.1 Το V3 φαινόμενο στην γενικευμένη αντιγονοπαρουσίαση

Ο αιτιολογικός παράγοντας της επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας είναι ο ιός του HIV. Το κύριο χαρακτηριστικό της μόλυνσης του HIV-1 είναι η βαθμιαία ελάττωση του αριθμού των CD4 T κυττάρων που οφείλεται σε αυξημένο κυτταρικό θάνατο και ανικανότητα του ομοιοστατικού μηχανισμού του οργανισμού να αναπληρώσει την απώλεια των κυττάρων. Η πλειονότητα των CD4 T κυττάρων που πεθαίνουν κατά την μακρά ασυμπτωματική φάση δεν έχουν μολυνθεί από τον ιό. Παρόλο που έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί τα ακριβή αίτια είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Αρκετές πρωτεΐνες του ιού έχουν προταθεί ότι εμπλέκονται στην παθογένεια του ιού, με επικρατέστερη την γλυκοπρωτεΐνη gp120, χωρίς όμως να υπάρχει κάποιος μηχανισμός που να εξηγεί την παθοφυσιολογία της μόλυνσης.

Μια θεωρία που επικρατεί αποδίδει τον κυτταρικό θάνατο στην χρόνια ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλώντας κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση. Μελέτες έδειξαν ότι η μόλυνση με τον HIV-2 ακολουθείται από χαμηλότερα επίπεδα ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος που εξηγεί τη πιο αργή μείωση των CD4 T κυττάρων (Michel, Balde et al. 2000) (Marlink, Kanki et al. 1994). Επίσης, μειωμένα επίπεδα ενεργοποίησης των T κυττάρων από την HIV-1 οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα μόλυνσης (Koning, Otto et al. 2005). Η σημασία της χρόνιας ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος από τον HIV-1 έγκειται στο γεγονός ότι η εξέλιξη της μόλυνσης είναι στενά συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και η έκφραση μαρτύρων ενεργοποίησης στα κύτταρα είναι πολλές φορές πιο χρήσιμη από ότι οι μετρήσεις του ιικού φορτίου και του αριθμού των T κυττάρων για την πρόγνωση της εξέλιξης της μόλυνσης (Hazenber, Otto et al. 2003) (Landay, Benning et al. 2003). Εάν όμως η αυξημένη απόπτωση των CD4 T κυττάρων οφείλεται στην χρόνια ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος τότε το ερώτημα είναι γιατί δεν παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο και σε άλλες χρόνιες ιογενείς μολύνσεις; Τι το ιδιαίτερο γνώρισμα έχει ο ιός του HIV που μπορεί να προκαλέσει τέτοιου είδους κυτταρικά φαινόμενα;

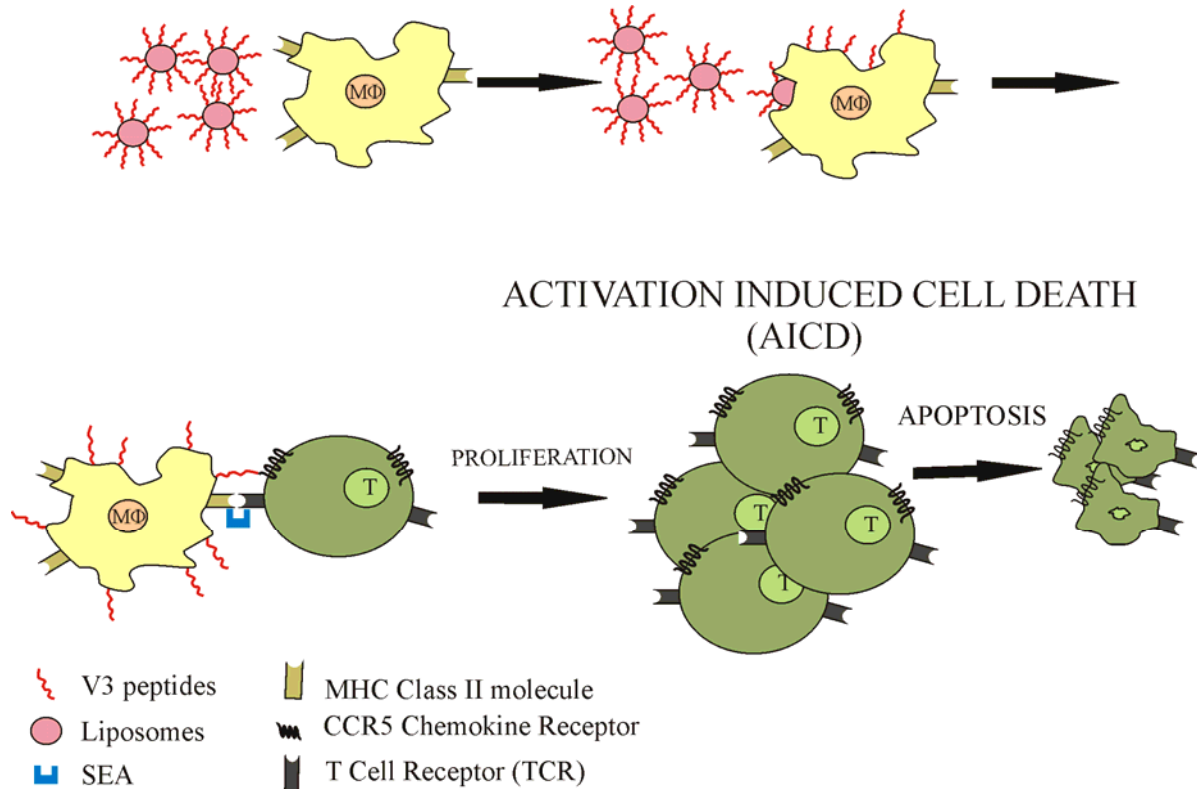
Θέλοντας να απαντήσουμε σε αυτά τα ερωτήματα, μελετήσαμε τον μηχανισμό με το οποίο ο ιός HIV-1 προκαλεί κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση και ιδιαίτερα την εμπλοκή της τρίτης μεταβλητής περιοχής (V3) της γλυκοπρωτεΐνης gp120 στην ενεργοποίηση και απόπτωση των κυττάρων. Η ιδιότητα του ιού να οδηγεί τα ενεργοποιημένα CD4/CD45RO T κύτταρα σε κυτταρικό θάνατο, γεγονός που δεν περιορίζεται μόνο στα HIV ειδικά T κύτταρα αλλά γενικά σε όλα τα T κύτταρα που απαντούν σε κάποιο αντιγόνο (Hazenbergh, Hamann et al. 2000), μας ώθησε να μελετήσουμε την παθογένεια του ιού από μια ανοσολογική σκοπιά και να διερευνήσουμε την εμπλοκή του V3 επιτόπου στον μηχανισμό της αντιγονοπαρουσίασης.

Προγενέστερες μελέτες της ερευνητικής ομάδας έδειξαν ότι το δεκαπενταμερές συνθετικό πεπτίδιο της V3 περιοχής όταν βρίσκεται στην κυτταρική μεμβράνη αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης, αλληλεπιδρά τουλάχιστον με τον υποδοχέα χημειοκινών CCR5 και προκαλεί ενισχυμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων ακολουθημένο από αυξημένη απόπτωση (Zafiropoulos, Baritaki et al. 2001) (Zafiropoulos, Baritaki et al. 2001) (Baritaki, Zafiropoulos et al. 2002; Krambovitis, Zafiropoulos et al. 2004; Krambovitis and Spandidos 2006). Η αντιγονοπαρουσίαση επιτεύχθηκε με την χρήση της τοξίνης του τετάνου σε PBMC από αιμοδότες που είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί με το εμβόλιο κατά του τετάνου. Επομένως το V3 φαινόμενο παρατηρήθηκε στα αναμνηστικά CD4/CD45RO T κύτταρα μνήμης που λόγω της ειδικότητας τους για τον τέτανο υπολογίζονται ότι απαντούν σε μία συχνότητα 1 στα 10^5 - 10^6 T κύτταρα. Θέλοντας να αποδείξουμε ότι το V3 φαινόμενο δεν εξαρτάται ειδικά από την αντιγονοπαρουσίαση της τοξίνης του τετάνου αλλά παρατηρείται γενικά κατά την διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης χρησιμοποιήσαμε την εντεροτοξίνη A του σταφυλόκοκκου. Η SEA προκαλεί ψευδό-αντιγονοπαρουσίαση με το να προσδένεται μη ειδικά στο τάξης II MCH μόριο και τον TCR ενεργοποιώντας περίπου το 25% των T κυττάρων.

Η ενισχυμένη ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων σε συνάρτηση με την αυξημένη απόπτωση και την ταυτοποίηση των CD4/CD45RO T κυττάρων ως τον κύριο υποπληθυσμό των T λεμφοκυττάρων που επηρεάζεται, αποδεικνύουν ότι το V3 φαινόμενο διατηρείται και στην γενικευμένη αντιγονοδιέγερση των κυττάρων και δεν είναι εξαρτώμενο από την ειδική αντιγονοπαρουσίαση του τετάνου. Τα αυξημένα

επίπεδα μαρτύρων ενεργοποίησης όπως ο υποδοχέας ιντερλευκίνης-2 CD25 και ο υποδοχέας απόπτωσης FAS (CD95) στα CD4/CD45RO T κύτταρα υποδεικνύουν την έντονη ενεργοποίηση των κυττάρων που το V3 πεπτίδιο προκαλεί. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς έχουν εμπλακεί στην ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων και θεωρούνται αρκετά σημαντικοί επαγωγείς κυτταρικού θανάτου επαγόμενου από ενεργοποίηση (Alderson, Tough et al. 1995) (Schmitz, Krueger et al. 2003). Σημαντικό ρόλο στο βιολογικό φαινόμενο πιθανόν να διαδραματίζει ο μεταγραφικός παράγοντας YY1, εφόσον ελάττωση των επιπέδων του mRNA του, την ημέρα με τον μέγιστο πολλαπλασιασμό όπως δείξαμε, συνοδεύεται με αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων CD95 και CCR5 των οποίων την έκφραση ρυθμίζει ανασταλτικά.

Η έντονη ενεργοποίηση των κυττάρων σηματοδοτεί την αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου που κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο (Mattson and Chan 2003; Lang, Foller et al. 2005). Η αύξηση των μαρτύρων ενεργοποίησης σε συνάρτηση με την αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου στις ίδιες χρονικές περιόδους που παρατηρήσαμε πειραματικά και η αυξημένη απόπτωση των κυττάρων συνάδουν στο ότι το V3 πεπτίδιο προκαλεί την έντονη ενεργοποίηση των κυττάρων καθιστώντας τα παράλληλα ευαίσθητα σε αποπτωτικά ερεθίσματα που τελικά οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο. Επομένως το πειραματικό μοντέλο που απεικονίζεται στην εικόνα 4.1 προβλέπει την ενσωμάτωση των λιποπεπτιδίων στην επιφάνεια των μακροφάγων τα οποία στην συνέχεια αλληλεπιδρούν με του υποδοχείς χημειοκινών στην επιφάνεια των T κυττάρων και κατά την διάρκεια της ψευδο-αντιγονοπαρουσίασης του SEA προκαλούν κυτταρικό θάνατο επαγόμενο με ενεργοποίηση στα CD4 T κύτταρα.

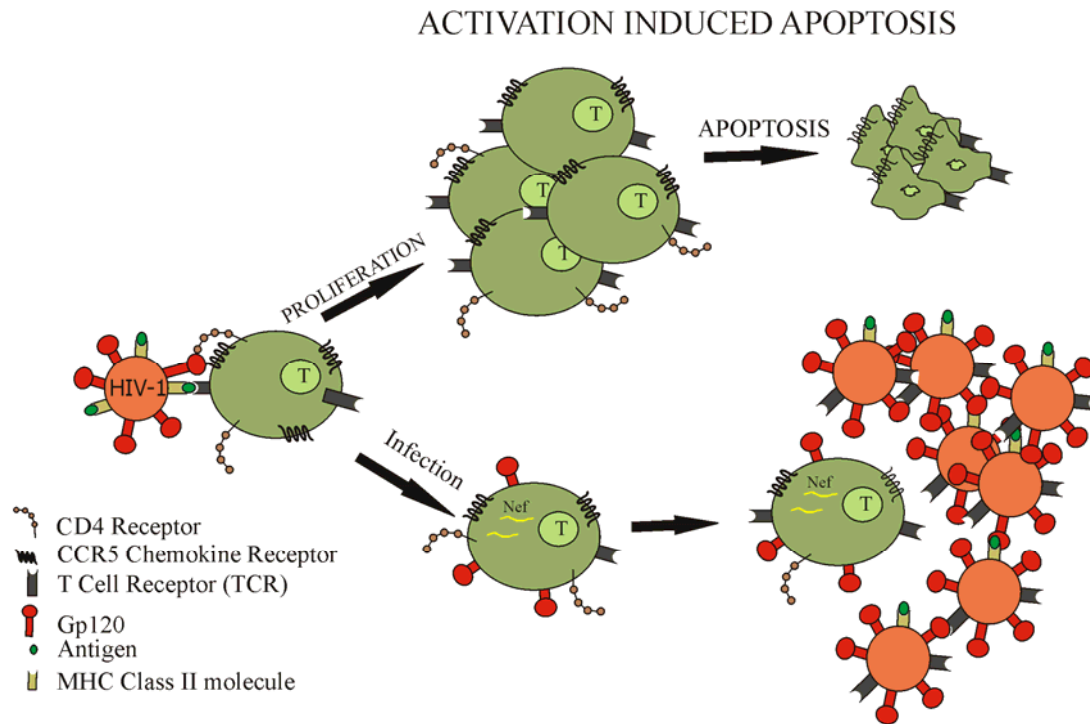


Εικ. 4.1. Περιγραφική απεικόνιση της πειραματικής διαδικασίας σε συνάρτηση με το βιολογικό φαινόμενο.

Το παραπάνω μοντέλο προσομοιάζει την κατάσταση των μολυσμένων μακροφάγων τα οποία κατά την μόλυνση τους από τον ιό HIV-1 εκφράζουν στην επιφάνεια τους την γλυκοπρωτεΐνη gp120. Επομένως προτείνουμε ότι τα μολυσμένα με τον ιό μακροφάγα, που έχουν ακόμα την ικανότητα να αντιγονοπαρουσιάζουν αντιγόνα, αλληλεπιδρούν με τα T κύτταρα. Κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης η gp120 αλληλεπιδρά με τουλάχιστον τον υποδοχέα χημειοκινών CCR5 επάγοντας την απόπτωση των κυττάρων (Krambovitis, Zafiroopoulos et al. 2004) (Krambovitis and Spandidos

2006). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι αρκετές μελέτες αναφέρουν την μεσολάβηση των APC στην επαγωγή έμμεσης απόπτωσης των μη μολυσμένων T κυττάρων (Herbein, Van Lint et al. 1998; Majumder, Venkatachari et al. 2007) (Oyaizu, Adachi et al. 1997).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πρωτεΐνες του κυττάρου, όπως το τάξης II MHC μόριο και ο υποδοχέας B7-2, ενσωματώνονται στον ιικό φάκελο του HIV-1 διατηρώντας την λειτουργικότητά τους (Arthur, Bess et al. 1992; Bounou, Dumais et al. 2001). Επομένως τα ιικά σωματίδια είναι ικανά να παρουσιάσουν αντιγόνα στα T κύτταρα προκαλώντας κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση. Αυτή η υπόθεση ενισχύεται από τις παρατηρήσεις των Holm *et al* και εξηγεί τα αυξημένα ποσοστά ενεργοποίησης και απόπτωσης που παρατηρήθηκαν όταν ιοσωμάτια είχαν ενσωματωμένα το τάξης II MHC μόρια και τον B7-2 υποδοχέα στον ιικό φάκελο (Holm and Gabuzda 2005). Ο HIV-1 μολύνει κατά προτίμηση ενεργοποιημένα T κύτταρα αφού ο ενδοκυτταρικός μηχανισμός αυτών των κυττάρων ευνοεί την αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος (Nabel and Baltimore 1987) (Lassen, Han et al. 2004). Όταν ο ιός επιτύχει την μόλυνση του κυττάρου, ιικές πρωτεΐνες όπως η Nef εμποδίζουν τους αποπτωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου (Greenway, McPhee et al. 2002) (Greenway, Holloway et al. 2003) (Fackler and Baur 2002). Έχοντας υπόψη ότι μόνο 1 στα 10.000 ιοσωμάτια είναι μολυσματικό, (Dimitrov, Willey et al. 1993) είναι πιθανόν ο ιός να χρησιμοποιεί την αντιγονοπαρουσίαση και το V3 φαινόμενο για να εξασφαλίσει την ενεργοποίηση των CD4 T κυττάρων στόχων, έτσι ώστε να είναι πιο αποτελεσματικά εργοστάσια παραγωγής ιοσωμίων. Σε περίπτωση αποτυχημένης ολοκλήρωσης της μόλυνσης τα T κύτταρα είναι καταδικασμένα να πεθάνουν από AICD (Baritaki, Zafiroopoulos et al. 2002) (Εικ. 4.2).



Εικ. 4.2. Σχηματική αναπαράσταση της πιθανολογούμενης δράσης του ιού κατά την μόλυνση του κυττάρου στόχου χρησιμοποιώντας το V3 φαινόμενο.

4.2 Ενδοκυτταρικά μονοπάτια

Από την στιγμή που η V3 περιοχή ενεργοποιεί τα T κύτταρα, ενδοκυτταρικά μονοπάτια δραστηριοποιούνται τα οποία οδηγούν σε AICD. Για να απαντήσουμε ποια είναι τα σημαντικότερα μονοπάτια πραγματοποιήθηκαν μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA για την εξακρίβωση των κυρίαρχων σημάτων που εμπλέκονται στο φαινόμενο V3. Η ανάλυση των δεδομένων ανέδειξε 378 γονίδια με στατιστικώς αυξημένα και 61 γονίδια με στατιστικώς μειωμένα επίπεδα mRNA, που δείχνει την πολυπλοκότητα του συστήματος.

4.2.1 Μεταγραφικός παράγοντας NFAT5

Επειδή ο αριθμός των γονιδίων ήταν μεγάλος επιλέχθηκαν συγκεκριμένα γονίδια για πρωταρχικές μελέτες τα οποία θεωρήσαμε σημαντικά. Ο μεταγραφικός παράγοντας NFAT5 (nuclear factor of activated T-cells 5) αποτελεί ίσως το πιο σημαντικό γονίδιο από το σύνολο των υπερ-μεταφρασμένων γονιδίων. Ο NFAT5 ανήκει στην οικογένεια των NFAT μεταγραφικών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων. Ενεργοποίηση των NFAT πρωτεϊνών απαιτεί την δράση της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης calcineurin η έκφραση της οποίας ρυθμίζεται από την αύξηση του επιπέδου των ενδοκυτταρικών ασβεστίων (Macian, Lopez-Rodriguez et al. 2001; Serfling, Berberich-Siebelt et al. 2004). Η calcineurin αποφωσφορυλιώνει τις NFAT πρωτεΐνες οι οποίες στην συνέχεια μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου όπου ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του κυττάρου. Η δομικές διαφορές της πρωτεΐνης NFAT5 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της ίδιας οικογένειας φαίνεται να επηρεάζουν και τις λειτουργικές της ιδιότητες. Έτσι η NFAT5 εκτός των άλλων φέρεται να μην διαθέτει την αντίστοιχη περιοχή πρόσδεσης της calcineurin που υπάρχει στις υπόλοιπες NFAT πρωτεΐνες. Για αυτό τον λόγο μεγαλύτερη βαρύτητα έχει δοθεί στην ικανότητα του NFAT5 να ρυθμίζει γονίδια που σχετίζονται με την ρύθμιση του οσμωτικού στρες, και υπερέκφραση του γονιδίου έχει συσχετισθεί με αύξηση της όσμωσης. Μελέτες έδειξαν ότι αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται απουσία της δράσης της calcineurin και για αυτό πιστεύεται πως είναι η κύρια λειτουργία του NFAT5 (Lopez-Rodriguez, Aramburu et al. 1999; Aramburu, Drews-Elger et al. 2006; Tong, Guo et al. 2006).

Έχει όμως την δυνατότητα αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας να ρυθμίζει την ενεργοποίηση των T κυττάρων κατά την αντιγονοπαρουσίαση και αν ναι, πώς ο συγκεκριμένος μηχανισμός σχετίζεται με το φαινόμενο του V3; Σύμφωνα με τους Trama *et al* ο NFAT5 έχει την λειτουργική ικανότητα να ρυθμίζει την ενεργοποίηση των T κυττάρων ύστερα από κάποιο αντιγονικό ερέθισμα ανεξαρτήτως του οσμωτικού στρες (Trama, Lu et al. 2000). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι συνέδεσαν αυτή την

ικανότητα με την παρουσία της calcineurin, εφόσον ένας αναστολέας της δράσης της, η κυκλοσπορίνη A (CsA), ανέστειλε την ενεργοποίηση του NFAT5 και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση των κυττάρων. Επίσης προτείνουν ότι η ενεργοποίηση του NFAT5 οφείλεται στην παρατεταμένη επαφή μεταξύ του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου και του T κυττάρου που οδήγησε στην αυξημένη σηματοδότηση. Συγκεκριμένα αναφέρουν ότι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο NF-kB και ο NFATc, ενεργοποιούνται σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ανάλογα με τα επίπεδα ασβεστίου και την διάρκεια της ενεργοποίησης από τον T υποδοχέα (Timmerman, Clipstone et al. 1996; Dolmetsch, Lewis et al. 1997; Dolmetsch, Xu et al. 1998). Έτσι ενώ ένα σύντομο σήμα με μικρή αύξηση των επιπέδων ασβεστίου μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση του NF-kB σε σύντομο χρονικό διάστημα (μερικά λεπτά), μεγαλύτερη αύξηση του επιπέδου ασβεστίου λόγω της παρατεταμένης ενεργοποίησης του TCR έχει ως αποτέλεσμα την διαρκή ενεργοποίηση της calcineurin, και ενδεχομένως και άλλων παραγόντων, που οδηγούν στην καθυστερημένη έκφραση του NFAT5. Επομένως αντιγόνα με μεγάλη συγγένεια που προκαλούν παρατεταμένη ισχυρή ενεργοποίηση του TCR έχουν ως αποτέλεσμα την συνεχόμενη αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου που οδηγεί στην έκφραση του NFAT5 με ένα μέχρι τώρα ανεξερεύνητο μηχανισμό που ενοχοποιεί την Calcineurin.

Συνεπώς η ενοχοποίηση του NFAT5 στο V3 φαινόμενο και η διαφαινόμενη ικανότητα του να ενεργοποιεί τα T κύτταρα ύστερα από παρατεταμένη ενεργοποίηση του TCR υποδοχέα παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για τον μηχανισμό παθογένειας του V3 επιτόπου εφόσον η διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης φέρεται να αποτελεί σημαντικό στάδιο στην ενισχυμένη ενεργοποίηση των T κυττάρων.

4.2.2 Υποδοχέας CD38

Το CD38 είναι ένας πολυλειτουργικός υποδοχέας που έχει εμπλακεί σε αρκετές κυτταρικές λειτουργίες όπως στον πολλαπλασιασμό, στην απόπτωση καθώς επίσης και στα ενδοκυτταρικά σήματα των T κυττάρων. Η λειτουργική του δράση διέπεται από την ικανότητα του υποδοχέα να προκαλεί αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου

ενεργοποιώντας περαιτέρω ενδοκυτταρικά μονοπάτια. Το πόσο σημαντικό ρόλο διαδραματίζει στην νόσο του AIDS αποδεικνύεται από το ότι ασθενείς μολυσμένοι με τον HIV-1 έχουν αυξημένο ποσοστό CD4 T κυττάρων με τον συγκεκριμένο υποδοχέα και η έκφραση του σχετίζεται με την επιδείνωση της ασθένειας. Γενικά η έκφραση του CD38 παρατηρείται κυρίως στα μη μολυσμένα ενεργοποιημένα T κύτταρα ιδιαίτερος κατά την ασυμπτωματική φάση (Giorgi, Ho et al. 1994; Lenkei, Bratt et al. 1998; Savarino, Calosso et al. 1999), γεγονός που συμβαδίζει με τα αποτελέσματα μας που δείχνουν υπερέκφραση του υποδοχέα στα ενεργοποιημένα CD4/CD45RO T κύτταρα. Επομένως τα αποτελέσματα μας προτείνουν ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα που παρατηρείται στα ενεργοποιημένα T κύτταρα των ασθενών πιθανόν να προκαλείται από την επίδραση της V3 περιοχής.

Ο μηχανισμός δράσης του CD38 στην παθογένεια του HIV-1 είναι ακόμα υπό διερεύνηση. Οι Savarino *et al* προτείνουν ότι το CD38 προσδένεται στον CD4 υποδοχέα σχηματίζοντας σύμπλοκα που ευνοούν την πρόσδεση με την gp120 (Savarino, Bottarel et al. 2000). Όσον αφορά την ενεργοποίηση των T κυττάρων προτείνουν ότι μπορεί να συμβάλει στο να βοηθάει στην ενεργοποίηση των στερημένων από νουκλεοτίδια κυττάρων. Αυτή η ιδιότητα μπορεί να ισχύει και στο V3 φαινόμενο, όμως λόγω της ιδιότητας του CD38 να επάγει αύξηση των επιπέδων ασβεστίου και επειδή αύξηση της έκφρασης στο πειραματικό μας μοντέλο συμπίπτει χρονικά με την αύξηση των επιπέδων ασβεστίου αλλά και την απόπτωση των κυττάρων, πιστεύουμε ότι ενδεχομένως να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή του AICD. Το CD38 έχει δείχτει ότι επάγει απόπτωση με την εμπλοκή της calcineurin εφόσον η απόπτωση των κυττάρων οφειλόταν σε αύξηση της έκφρασης του FAS υποδοχέα η οποία ήταν παράλληλη με την αύξηση του CD38 και η απόπτωση αναστάλη όταν χρησιμοποίησαν κυκλοσπορίνη A (Morra, Zubiaur et al. 1998). Η επαγωγή της απόπτωσης ήταν μεγαλύτερη όταν υπήρχε το συνδιεγερτικό σήμα του CD28. Ένας πιθανός μηχανισμός είναι η αύξηση της έκφρασης του CD38 να προκάλεσε αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου που οδηγεί στην ενεργοποίηση της calcineurin και κατ' επέκταση ενεργοποίηση των NFAT μεταγραφικών παραγόντων. Συνεπώς η αύξηση του CD38 από το V3 πεπτίδιο πιθανολογείται ότι δεν είναι απλά μάρτυρας ενεργοποίησης αλλά ίσως να έχει ενεργό ρόλο στο βιολογικό φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου

4.3 Προτεινόμενος μηχανισμός

Τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, εκτός του ότι εναποθέτουν μία σημαντική βάση δεδομένων για την περαιτέρω μελέτη των ενδοκυτταρικών σημάτων του V3 φαινομένου, προσδίδουν συνάμα αρκετά ενδεικτικά στοιχεία για τον μηχανισμό δράσης του V3 επιτόπου που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα, η αύξηση των υποδοχέων CD38, CD25 και CD95 στις ίδιες χρονικές περιόδους που παρατηρείται η αύξηση των επιπέδων ενδοκυτταρικού ασβεστίου και η αυξημένη απόπτωση, συνηγορούν στην παρατεταμένη ενεργοποίηση των κυττάρων που προκάλεσε το V3 και είχε ως αποτέλεσμα την απόπτωση των κυττάρων. Ως επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης εναποθέεται η εμπλοκή του μεταγραφικού παράγοντα NFAT5, ο οποίος φαίνεται να ενεργοποιείται από παρατεταμένη ενεργοποίηση του TCR υποδοχέα. Συνεπώς το προτεινόμενο μοντέλο υποθέτει ότι το V3 εμπλέκεται στο διεγερτικό σήμα που προκαλείτε κατά την αντιγονοπαρουσίαση με αποτέλεσμα να προκαλεί την αύξηση των επιπέδων ασβεστίου που οδηγεί στην έκφραση του NFAT5 και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του κυττάρου.

Ένας πιθανός μηχανισμός για την ενισχυμένη ενεργοποίηση των T κυττάρων πιστεύεται ότι μπορεί να αποτελεί το φαινόμενο που περιγράφηκε από τους Molon *et al.* Στην μελέτη τους πάνω στους υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4, και την εμπλοκή τους στο σήμα της αντιγονοπαρουσίασης, έδειξαν ότι κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης οι συγκεκριμένοι υποδοχείς στρατολογούνται στην ανοσολογική σύναψη κοντά στον TCR και ρυθμίζουν την διάρκεια της διαδικασίας (Molon, Gri *et al.* 2005). Πιο συγκεκριμένα έδειξαν ότι οι συγκεκριμένοι υποδοχείς αλληλεπιδρούν με τους φυσιολογικούς τους δεσμευτές στην επιφάνεια των APC, γεγονός που παρατείνει την διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης και συντελεί σε ενισχυμένο σήμα ενεργοποίησης στα T κύτταρα (Viola, Contento *et al.* 2006).

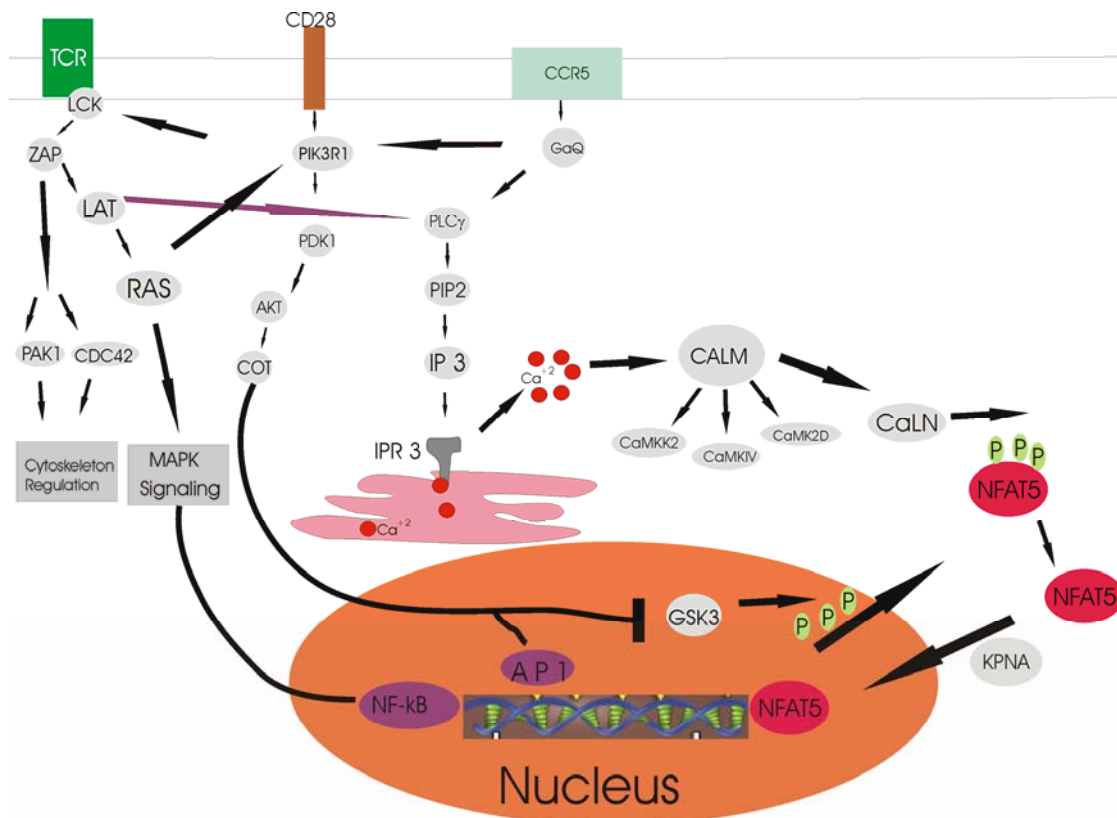
Σύμφωνα με το προτεινόμενο μοντέλο του V3 φαινομένου βασιζόμενο σε μία ανσοική σύναψη, το πεπτίδιο βρίσκεται στην επιφάνεια των APC και αλληλεπιδρώντας τουλάχιστον με τον υποδοχέα χημειοκινών CCR5, προκαλεί ενισχυμένη ενεργοποίηση

των T κυττάρων κατά την αντιγονοπαρουσίαση. Επειδή η τοποθέτηση του πεπτιδίου στην επιφάνεια των APC είναι αρκετά σταθερή και η αλληλεπίδραση με τον CCR5 είναι ιοντικής φύσεως, πιστεύεται ότι το V3 αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα CCR5 στο σημείο της ανοσολογικής σύναψης, ενισχύοντας την γενική πρόσδεση του T κυττάρου στα APC, και προκαλώντας έτσι παρατεταμένη ενεργοποίηση του κυττάρου. Το παρατεταμένο σήμα διέγερσης έχει ως αποτέλεσμα την διαρκή αύξηση των επιπέδων ασβεστίου που οδηγεί, μέσω της calcineurin, στην ενεργοποίηση του NFAT5. Εκτός της δράσης του CCR5 ως συνδετικού μορίου για την επιμήκυνση της διάρκειας της αντιγονοπαρουσίασης, σαν υποδοχέας χημειοκινών, έχει την ικανότητα να αυξάνει την συγκέντρωση των ασβεστίων οπότε σε συνάρτηση με τα συνδιεγερτικά σήματα ενδέχεται να έχει διπλό ρόλο με το να συμβάλει με ενδοκυτταρικά σήματα στην ενεργοποίηση του T κυττάρου (Oppermann 2004).

Εκτός από τα επιβεβαιωμένα αποτελέσματα, η ανάλυση των μικροσυστοιχιών ανέδειξε γονίδια των οποίων η έκφραση δεν έχει επιβεβαιωθεί και αποτελούν σημαντικά κομμάτια στην συμπλήρωση της εικόνας των ενδοκυτταρικών σημάτων που συμβάλουν στην ενεργοποίηση του NFAT5. Τέτοια γονίδια είναι το IPTR2 που είναι ο υποδοχέας του ενδοπλασματικού δικτύου που σχετίζεται με την απελευθέρωση των ιόντων ασβεστίου που βρίσκονται αποθηκευμένα μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (Hernandez, Leite et al. 2007) (Endo, Harada et al. 2006), η πρωτεΐνη KPNA που μεταφέρει τις NFAT πρωτεΐνες στον πυρήνα, και τα γονίδια CAMKK2, CAMK1D, CAMK2D που μαζί με την calcineurin ενεργοποιούνται από την calmodulin μέσω της αύξησης των επιπέδων ασβεστίου (Εικ 4.3). Επίσης παρατηρείται αυξημένη μετάφραση στα γονίδια, όπως το PK3R1, PDK1 και COT, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι του υποδοχέα CD28 οποίος μεταδίδει συνδιεγερτικό σήμα κατά την διάρκεια της αντιγονοπαρουσίασης και το οποίο σχετίζεται με την χρονική διάρκεια της πρόσδεσης. Η επιβεβαίωση της εμπλοκής ή όχι των παραπάνω γονιδίων θα δώσει σημαντικές πληροφορίες για την εξακρίβωση των αρχικών μονοπατιών που οδηγούν στην ενεργοποίηση του κυττάρου.

Ο παραπάνω μηχανισμός πιστεύεται ότι προκαλεί τα πρωταρχικά σήματα που αποτελούν την απαρχή του βιολογικού φαινομένου στα T κύτταρα. Η παρατεταμένη σηματοδότηση οδηγεί σε ενεργοποίηση του NFAT5 που προκαλεί την έντονη διέγερση

του κυττάρου και την έκφραση των μαρτύρων ενεργοποίησης, CD25, CD38 και CD95. Στην έκφραση του CD95 και του CCR5 πολύ πιθανόν να συμμετέχει και ο μεταγραφικός παράγοντας YY1 ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση του CD95 και του CCR5. Το παρατεταμένο σήμα ενεργοποίησης και η συνεχιζόμενη αύξηση των επιπέδων ασβεστίου στην οποία συμβάλει και ο υποδοχέας CD38, προκαλεί υπερβολική διέγερση και τελικά τον θάνατο του κυττάρου.



Εικ.4.3. Προτεινόμενο μοντέλο ενεργοποίησης του T κυττάρου από το V3 επίτοπο κατά την αντιγονοπαρουσίαση. Τα ενδοκυτταρικά σήματα από τον TCR και τους συνυποδοχείς οδηγούν στην αύξηση των επιπέδων ασβεστίου και στην ενεργοποίηση του NFAT5.

4.4 Θεραπευτικές προεκτάσεις του V3 φαινομένου

Η υπάρχουσα αντιρετροϊκή θεραπεία κατάφερε να αυξήσει το προσδόκιμο ζωής των ασθενών αλλά δεν είναι ικανή να καταπολεμήσει αποτελεσματικά την μόλυνση του HIV-1, καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για ορθολογικό σχεδιασμό φαρμακευτικών σκευασμάτων. Για την διεκπεραίωση του σχεδιασμού είναι απαραίτητη η κατανόηση του ακριβούς μηχανισμού παθογένειας του HIV-1 έτσι ώστε τα μελλοντικά φάρμακα να καταπολεμούν τον μηχανισμό δράσης και όχι τα επακόλουθα συμπτώματα της μόλυνσης. Η μελέτη του V3 φαινομένου, από την ερευνητική μας ομάδα, έχει προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την παθογένεια του HIV-1 που μπορούν να συμβάλουν για μια πιο αποτελεσματική θεραπεία.

Βασιζόμενοι σε μελέτες που αποδίδουν την απόπτωση των μη μολυσμένων T κυττάρων σε κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση ο οποίος όμως δεν έχει προκληθεί από τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TCR αλλά από ενεργοποίηση από κυτοκίνες (Unutmaz, Pileri et al. 1994; Bangs, McMichael et al. 2006) θελήσαμε να ερευνήσουμε περαιτέρω το φαινόμενο του V3 επώζοντας τα κύτταρα με ιντερλευκίνη-2 απουσία του υπερ-αντιγόνου. Ο ενισχυμένος πολλαπλασιασμός που παρατηρήθηκε παρουσία του V3 πεπτιδίου ακολουθούμενος με την έστω και ελάχιστη αυξημένη απόπτωση, συνηγορούν στο ότι όντως η παρουσία της IL-2 σε συνδυασμό με τον V3 επίτοπο του HIV-1 δύναται να επάγει κυτταρικό θάνατο επαγόμενο από ενεργοποίηση, χωρίς όμως να φτάνει τα επίπεδα του αντιγονικού συστήματος. Σε περιπτώσεις όπου υπάρχει χρόνια ενεργοποίηση και τα περισσότερα T κύτταρα βρίσκονται σε ενεργοποιημένη κατάσταση με όλους τους δείκτες ενεργοποίησης αυξημένους, συμπεριλαμβανομένου και του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 2, CD25, έχει δειχθεί ότι η IL-2 είναι υπεύθυνη για την ρύθμιση της απόπτωσης των κυττάρων (Schmitz, Krueger et al. 2003) (Schimpl, Berberich et al. 2002). Κάτι παρόμοιο μπορεί να συμβαίνει στην μόλυνση του HIV που παρατηρείται χρόνια ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και αύξηση των δεικτών ενεργοποίησης των T κυττάρων (Landay, Benning et al. 2003) (Hazenber, Otto et al. 2003). Παρόλο που η IL-2 χορηγείται ως θεραπεία στους ασθενείς με AIDS για να αυξηθούν τα ποσοστά των CD4 T κυττάρων, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι αυτή η αύξηση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που

παρατηρείται στους ασθενείς είναι πλασματική διότι συνοδεύεται από αυξημένη απόπτωση των ίδιων κυττάρων (Sereti, Herpin et al. 2001). Επομένως η παρουσία του V3 μπορεί να εξηγεί τον AICD που παρατηρείται σε ασθενείς με την χορήγηση της ιντερλευκίνης-2 και χρήζει περαιτέρω μελέτης για την διερεύνηση του ακριβή μηχανισμού και των ενδοκυτταρικών σημάτων που εμπλέκονται.

Τέλος, η επίδραση του V3 επίτοπου στην επαγωγή ενισχυμένης ενεργοποίησης των κυττάρων που ακολουθείται από αυξημένη απόπτωση προσδίδει χρήσιμες πληροφορίες για τον πιθανό σχεδιασμό αναστολέων που θα δρουν στο στάδιο της ενεργοποίησης και όχι της απόπτωσης των T κυττάρων. Μελέτες έδειξαν ότι παρεμπόδιση της απόπτωσης των CD4 T κυττάρων με την αδενουική πρωτεΐνη E1B 19K προκάλεσαν αύξηση της μόλυνσης και παράγωγη ισοωματίων (Antoni, Sabbatini et al. 1995). Μειωμένα επίπεδα ενεργοποίησης των T κυττάρων από την HIV-1 οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα μόλυνσης (Koning, Otto et al. 2005). Οπότε λαμβάνοντας υπόψη ότι το φαινόμενο V3 επάγει την απόπτωση των κυττάρων αφού πρώτα προκαλέσει την έντονη ενεργοποίησή τους, προτείνεται ότι αναστολείς της ενεργοποίησης των κυττάρων θα ήταν πιο αποτελεσματικοί στην διατήρηση των CD4 κυττάρων αφού τα κύτταρα δεν θα πέθαιναν από AICD και επίσης θα ελαττωνόταν η μολυσματικότητα του ιού. Βασισμένοι σε αυτήν την θεωρία και σύμφωνα με προγενέστερες μελέτες του εργαστηρίου που έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση του V3 με τον CCR5 υποδοχέα είναι ιοντικής φύσεως, χρησιμοποιήσαμε συνθετικά πεπτίδια με θετικά φορτισμένα αμινοξέα τα οποία προσδένονται στους συνυποδοχείς του ιού και παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση της gp120 με τους συνυποδοχείς. Με αυτόν τον τρόπο πετύχαμε όχι μόνο την παρεμπόδιση της μόλυνσης (Baritaki, Dittmar et al. 2005) αλλά και αναστολή του V3 φαινομένου σε μη μολυσμένα κύτταρα (Porichis, Vlata et al. 2007). Οπότε, μια πιθανή προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η χρήση συνθετικών πεπτιδίων με ισχυρότερη ιοντική επίδραση από ότι αυτή του V3 επίτοπου του ιού για να παρεμποδίσουμε τον μολυσματικό κύκλο από τα APC στα T κύτταρα.

5. Βιβλιογραφία

- Akari, H., S. Bour, et al. (2001). "The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors." J Exp Med **194**(9): 1299-311.
- Alderson, M. R., T. W. Tough, et al. (1995). "Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes." J Exp Med **181**(1): 71-7.
- Alessio, M., S. Roggero, et al. (1990). "CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasma cells." J Immunol **145**(3): 878-84.
- Altfeld, M., E. S. Rosenberg, et al. (2001). "Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection." J Exp Med **193**(2): 169-80.
- Antoni, B. A., P. Sabbatini, et al. (1995). "Inhibition of apoptosis in human immunodeficiency virus-infected cells enhances virus production and facilitates persistent infection." J Virol **69**(4): 2384-92.
- Aramburu, J., K. Drews-Elger, et al. (2006). "Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5." Biochem Pharmacol **72**(11): 1597-604.
- Arch, R. H. and C. B. Thompson (1999). "Lymphocyte survival--the struggle against death." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 113-40.
- Arthur, L. O., J. W. Bess, Jr., et al. (1992). "Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines." Science **258**(5090): 1935-8.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-8.
- Ausiello, C. M., A. la Sala, et al. (1996). "Secretion of IFN-gamma, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-10 cytokines after activation of human purified T lymphocytes upon CD38 ligation." Cell Immunol **173**(2): 192-7.
- Balaban, N. and A. Rasooly (2000). "Staphylococcal enterotoxins." Int J Food Microbiol **61**(1): 1-10.
- Bangs, S. C., A. J. McMichael, et al. (2006). "Bystander T cell activation--implications for HIV infection and other diseases." Trends Immunol **27**(11): 518-24.

- Baritaki, S., M. T. Dittmar, et al. (2005). "In vitro inhibition of R5 HIV-1 infectivity by X4 V3-derived synthetic peptides." Int J Mol Med **16**(2): 333-6.
- Baritaki, S., A. Zafiropoulos, et al. (2002). "Ionic interaction of the HIV-1 V3 domain with CCR5 and deregulation of T lymphocyte function." Biochem Biophys Res Commun **298**(4): 574-80.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, 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.
- Bernstein, H. B., S. P. Tucker, et al. (1995). "Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41." J Virol **69**(5): 2745-50.
- Berson, J. F., D. Long, et al. (1996). "A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains." J Virol **70**(9): 6288-95.
- Bjorndal, A., A. Sonnerborg, et al. (1999). "Phenotypic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates of Ethiopian AIDS patients." AIDS Res Hum Retroviruses **15**(7): 647-53.
- Bleul, C. C., L. Wu, et al. (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1925-30.
- Bomsel, M. (1997). "Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier." Nat Med **3**(1): 42-7.
- Bounou, S., N. Dumais, et al. (2001). "Attachment of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) particles bearing host-encoded B7-2 proteins leads to nuclear factor-kappa B- and nuclear factor of activated T cells-dependent activation of HIV-1 long terminal repeat transcription." J Biol Chem **276**(9): 6359-69.
- Budihardjo, I., H. Oliver, et al. (1999). "Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 269-90.
- Bunning, V. K., J. A. Lindsay, et al. (1997). "Chronic health effects of microbial foodborne disease." World Health Stat Q **50**(1-2): 51-6.
- Cantin, R., J. F. Fortin, et al. (1997). "The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity." J Virol **71**(3): 1922-30.

- Cen, S., A. Khorchid, et al. (2001). "Incorporation of lysyl-tRNA synthetase into human immunodeficiency virus type 1." J Virol **75**(11): 5043-8.
- Chambers, P., C. R. Pringle, et al. (1990). "Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins." J Gen Virol **71** (Pt 12): 3075-80.
- Champagne, E., A. Hucheq, et al. (1993). "An alternative method for T-cell receptor repertoire analysis: clustering of human V-beta subfamilies selected in responses to staphylococcal enterotoxins B and E." Mol Immunol **30**(10): 877-86.
- Chan, F. K., H. J. Chun, et al. (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." Science **288**(5475): 2351-4.
- Chinen, J. and W. T. Shearer (2002). "Molecular virology and immunology of HIV infection." J Allergy Clin Immunol **110**(2): 189-98.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, et al. (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." Cell **81**(4): 505-12.
- Chu, D. H., C. T. Morita, et al. (1998). "The Syk family of protein tyrosine kinases in T-cell activation and development." Immunol Rev **165**: 167-80.
- Clerici, M., N. I. Stocks, et al. (1989). "Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging." J Clin Invest **84**(6): 1892-9.
- Cooper, D. A., B. Tindall, et al. (1988). "Characterization of T lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus." J Infect Dis **157**(5): 889-96.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." Nat Rev Cancer **2**(9): 647-56.
- Dahl, S. C., J. S. Handler, et al. (2001). "Hypertonicity-induced phosphorylation and nuclear localization of the transcription factor TonEBP." Am J Physiol Cell Physiol **280**(2): C248-53.
- Dagleish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-7.

- De Clercq, E. (2004). "Antiviral drugs in current clinical use." *J Clin Virol* **30**(2): 115-33.
- De Flora, A., E. Zocchi, et al. (2004). "Autocrine and paracrine calcium signaling by the CD38/NAD⁺/cyclic ADP-ribose system." *Ann N Y Acad Sci* **1028**: 176-91.
- de Martini, R. M., R. R. Turner, et al. (1988). "Peripheral blood mononuclear cell abnormalities and their relationship to clinical course in homosexual men with HIV infection." *Clin Immunol Immunopathol* **46**(2): 258-71.
- de Roda Husman, A. M., R. P. van Rij, et al. (1999). "Adaptation to promiscuous usage of chemokine receptors is not a prerequisite for human immunodeficiency virus type 1 disease progression." *J Infect Dis* **180**(4): 1106-15.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." *Nature* **381**(6584): 661-6.
- Denny, C. B., J. Y. Humber, et al. (1971). "Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer." *Appl Microbiol* **21**(6): 1064-6.
- Dewaste, V., C. Moreau, et al. (2003). "The three isoenzymes of human inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinase show specific intracellular localization but comparable Ca²⁺ responses on transfection in COS-7 cells." *Biochem J* **374**(Pt 1): 41-9.
- Dhein, J., H. Walczak, et al. (1995). "Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)." *Nature* **373**(6513): 438-41.
- Dimitrov, D. S., R. L. Willey, et al. (1993). "Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics." *J Virol* **67**(4): 2182-90.
- Dion, M. L., J. F. Poulin, et al. (2004). "HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation." *Immunity* **21**(6): 757-68.
- Dockrell, D. H., A. D. Badley, et al. (1999). "Activation-induced CD4⁺ T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4⁺ T cell count, and HIV plasma viral copy number." *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**(17): 1509-18.
- Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, et al. (1997). "Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration." *Nature* **386**(6627): 855-8.

- Dolmetsch, R. E., K. Xu, et al. (1998). "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression." Nature **392**(6679): 933-6.
- Douek, D. C., J. M. Brenchley, et al. (2002). "HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells." Nature **417**(6884): 95-8.
- Douek, D. C., L. J. Picker, et al. (2003). "T cell dynamics in HIV-1 infection." Annu Rev Immunol **21**: 265-304.
- Dragic, T., V. Litwin, et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature **381**(6584): 667-73.
- Dunn, B. M., M. M. Goodenow, et al. (2002). "Retroviral proteases." Genome Biol **3**(4): REVIEWS3006.
- Endo, Y., K. Harada, et al. (2006). "Organelles containing inositol trisphosphate receptor type 2 in adrenal medullary cells." J Physiol Sci **56**(6): 415-23.
- Evenson, M. L., M. W. Hinds, et al. (1988). "Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk." Int J Food Microbiol **7**(4): 311-6.
- Fackler, O. T., A. Alcover, et al. (2007). "Modulation of the immunological synapse: a key to HIV-1 pathogenesis?" Nat Rev Immunol **7**(4): 310-7.
- Fackler, O. T. and A. S. Baur (2002). "Live and let die: Nef functions beyond HIV replication." Immunity **16**(4): 493-7.
- Farnet, C. M. and F. D. Bushman (1996). "HIV cDNA integration: molecular biology and inhibitor development." Aids **10 Suppl A**: S3-11.
- Farzan, M., H. Choe, et al. (1998). "Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain." J Virol **72**(9): 7620-5.
- Fernandez, J. E., S. Deaglio, et al. (1998). "Analysis of the distribution of human CD38 and of its ligand CD31 in normal tissues." J Biol Regul Homeost Agents **12**(3): 81-91.
- Ferri, K. F., E. Jacotot, et al. (2000). "Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases." J Exp Med **192**(8): 1081-92.

- Fornierod, M., M. Ohno, et al. (1997). "CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals." Cell **90**(6): 1051-60.
- Franco, L., L. Guida, et al. (1998). "The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes." Faseb J **12**(14): 1507-20.
- Freed, E. O. and A. J. Mouland (2006). "The cell biology of HIV-1 and other retroviruses." Retrovirology **3**: 77.
- Freitas, A. A. and B. Rocha (1999). "Peripheral T cell survival." Curr Opin Immunol **11**(2): 152-6.
- Friday, B. B. and A. A. Adjei (2005). "K-ras as a target for cancer therapy." Biochim Biophys Acta **1756**(2): 127-44.
- Funaro, A., G. C. Spagnoli, et al. (1990). "Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation." J Immunol **145**(8): 2390-6.
- Galanakis, P. A., G. A. Spyroulias, et al. (2005). "Conformational properties of HIV-1 gp120/V3 immunogenic domains." Curr Med Chem **12**(13): 1551-68.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865-7.
- Garban, H. J. and B. Bonavida (2001). "Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: a pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells." J Immunol **167**(1): 75-81.
- Gerwien, J., M. Nielsen, et al. (1999). "Cutting edge: TCR stimulation by antibody and bacterial superantigen induces Stat3 activation in human T cells." J Immunol **163**(4): 1742-5.
- Geyer, M., O. T. Fackler, et al. (2001). "Structure--function relationships in HIV-1 Nef." EMBO Rep **2**(7): 580-5.
- Giorgi, J. V., H. N. Ho, et al. (1994). "CD8+ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR+ CD38- CD8+ cells is associated with subsequent stable CD4+ cell levels. The Multicenter AIDS Cohort Study Group." J Infect Dis **170**(4): 775-81.

- Gonzalez, P. A., L. J. Carreno, et al. (2007). "Modulation of immunological synapse by membrane-bound and soluble ligands." Cytokine Growth Factor Rev **18**(1-2): 19-31.
- Gorak-Stolinska, P., D. M. Kemeny, et al. (2002). "Activation-induced cell death in human T cells is a suicidal process regulated by cell density but superantigen induces T cell fratricide." Cell Immunol **219**(2): 98-107.
- Gordon, S., G. Akopyan, et al. (2006). "Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology." Oncogene **25**(8): 1125-42.
- Gougeon, M. L., H. Lecoecur, et al. (1996). "Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression." J Immunol **156**(9): 3509-20.
- Green, D. and G. Kroemer (1998). "The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?" Trends Cell Biol **8**(7): 267-71.
- Greenway, A. L., G. Holloway, et al. (2003). "HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication." J Biosci **28**(3): 323-35.
- Greenway, A. L., D. A. McPhee, et al. (2002). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis." J Virol **76**(6): 2692-702.
- Groux, H., G. Torpier, et al. (1992). "Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals." J Exp Med **175**(2): 331-40.
- Gulow, K., M. Kaminski, et al. (2005). "HIV-1 trans-activator of transcription substitutes for oxidative signaling in activation-induced T cell death." J Immunol **174**(9): 5249-60.
- Harrop, H. A. and C. C. Rider (1998). "Heparin and its derivatives bind to HIV-1 recombinant envelope glycoproteins, rather than to recombinant HIV-1 receptor, CD4." Glycobiology **8**(2): 131-7.

- Hatzidakis, G. I., A. M. Tsatsakis, et al. (2002). "Use of L-lysine fluorescence derivatives as tracers to enhance the performance of polarization fluoroimmunoassays. A study using two herbicides as model antigens." Anal Chem **74**(11): 2513-21.
- Hazenberg, M. D., D. Hamann, et al. (2000). "T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock." Nat Immunol **1**(4): 285-9.
- Hazenberg, M. D., S. A. Otto, et al. (2003). "Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS." Aids **17**(13): 1881-8.
- Heinkelein, M., M. Muller, et al. (1997). "Rapid and selective depletion of CD4+ T lymphocytes and preferential loss of memory cells on interaction of mononuclear cells with HIV-1 glycoprotein-expressing cells." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **16**(2): 74-82.
- Herbein, G., C. Van Lint, et al. (1998). "Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander T lymphocytes." J Virol **72**(1): 660-70.
- Hernandez, E., M. F. Leite, et al. (2007). "The spatial distribution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms shapes Ca²⁺ waves." J Biol Chem **282**(13): 10057-67.
- Hernandez, F. J., J. Goyache, et al. (1993). "Repair and enterotoxin synthesis by *Staphylococcus aureus* after thermal shock." Appl Environ Microbiol **59**(5): 1515-9.
- Holm, G. H. and D. Gabuzda (2005). "Distinct mechanisms of CD4+ and CD8+ T-cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions." J Virol **79**(10): 6299-311.
- Holtz-Heppelmann, C. J., A. Algeciras, et al. (1998). "Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region." J Biol Chem **273**(8): 4416-23.
- Hout, D. R., E. R. Mulcahy, et al. (2004). "Vpu: a multifunctional protein that enhances the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1." Curr HIV Res **2**(3): 255-70.
- Howard, M., J. C. Grimaldi, et al. (1993). "Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38." Science **262**(5136): 1056-9.

- Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." Cell **103**(6): 839-42.
- Hudson, K. R., H. Robinson, et al. (1993). "Two adjacent residues in staphylococcal enterotoxins A and E determine T cell receptor V beta specificity." J Exp Med **177**(1): 175-84.
- Imamichi, T. (2004). "Action of anti-HIV drugs and resistance: reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors." Curr Pharm Des **10**(32): 4039-53.
- Jiang, M. and J. Milner (2003). "Bcl-2 constitutively suppresses p53-dependent apoptosis in colorectal cancer cells." Genes Dev **17**(7): 832-7.
- Johnson, H. M., J. K. Russell, et al. (1991). "Staphylococcal enterotoxin microbial superantigens." Faseb J **5**(12): 2706-12.
- Ju, S. T., D. J. Panka, et al. (1995). "Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation." Nature **373**(6513): 444-8.
- Kaufmann, G. R., P. Cunningham, et al. (1998). "Patterns of viral dynamics during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. The Sydney Primary HIV Infection Study Group." J Infect Dis **178**(6): 1812-5.
- Klatzmann, D., E. Champagne, et al. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." Nature **312**(5996): 767-8.
- Koning, F. A., S. A. Otto, et al. (2005). "Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection." J Immunol **175**(9): 6117-22.
- Krambovitis, E., G. Hatzidakis, et al. (1998). "Preparation of MUC-1 oligomers using an improved convergent solid-phase peptide synthesis." J Biol Chem **273**(18): 10874-9.
- Krambovitis, E., F. Porichis, et al. (2005). "HIV entry inhibitors: a new generation of antiretroviral drugs." Acta Pharmacol Sin **26**(10): 1165-73.
- Krambovitis, E. and D. A. Spandidos (2006). "HIV-1 infection: is it time to reconsider our concepts?" Int J Mol Med **18**(1): 3-8.
- Krambovitis, E., A. Zafiroopoulos, et al. (2004). "Simple electrostatic interaction mechanisms in the service of HIV-1 pathogenesis." Scand J Immunol **59**(2): 231-4.

- Kranenburg, O. (2005). "The KRAS oncogene: past, present, and future." Biochim Biophys Acta **1756**(2): 81-2.
- Kuo, C. T. and J. M. Leiden (1999). "Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function." Annu Rev Immunol **17**: 149-87.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, et al. (1998). "Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody." Nature **393**(6686): 648-59.
- Landay, A., L. Benning, et al. (2003). "Correlates of immune activation marker changes in human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and high-risk HIV-seronegative women who use illicit drugs." J Infect Dis **188**(2): 209-18.
- Lang, F., M. Foller, et al. (2005). "Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death." J Membr Biol **205**(3): 147-57.
- Lassen, K., Y. Han, et al. (2004). "The multifactorial nature of HIV-1 latency." Trends Mol Med **10**(11): 525-31.
- Latinis, K. M., L. A. Norian, et al. (1997). "Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells." J Biol Chem **272**(50): 31427-34.
- Laurent-Crawford, A. G., B. Krust, et al. (1993). "Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells." AIDS Res Hum Retroviruses **9**(8): 761-73.
- Le Rouzic, E. and S. Benichou (2005). "The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle." Retrovirology **2**: 11.
- Lee, S. D., E. Colla, et al. (2003). "Multiple domains of TonEBP cooperate to stimulate transcription in response to hypertonicity." J Biol Chem **278**(48): 47571-7.
- Lenkei, R., G. Bratt, et al. (1998). "Indicators of T-cell activation: correlation between quantitative CD38 expression and soluble CD8 levels in asymptomatic HIV+ individuals and healthy controls." Cytometry **33**(2): 115-22.
- Leonard, C. K., M. W. Spellman, et al. (1990). "Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **265**(18): 10373-82.

- Levine, W. C., J. F. Smart, et al. (1991). "Foodborne disease outbreaks in nursing homes, 1975 through 1987." Jama **266**(15): 2105-9.
- Li, H., A. Llera, et al. (1999). "The structural basis of T cell activation by superantigens." Annu Rev Immunol **17**: 435-66.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-89.
- Lifson, J. D., G. R. Reyes, et al. (1986). "AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen." Science **232**(4754): 1123-7.
- Liu, H., M. A. Lampe, et al. (1991). "Conventional antigen and superantigen may be coupled to distinct and cooperative T-cell activation pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(19): 8705-9.
- Llewelyn, M. and J. Cohen (2002). "Superantigens: microbial agents that corrupt immunity." Lancet Infect Dis **2**(3): 156-62.
- Loetscher, P., M. Seitz, et al. (1996). "Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes." J Exp Med **184**(2): 569-77.
- Loetscher, P., M. Ugucioni, et al. (1998). "CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes." Nature **391**(6665): 344-5.
- Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, et al. (2001). "Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress." Immunity **15**(1): 47-58.
- Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, et al. (1999). "NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7214-9.
- Lu, M., S. C. Blacklow, et al. (1995). "A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein." Nat Struct Biol **2**(12): 1075-82.
- Ludanyi, K., P. Gogolak, et al. (2004). "Fine-tuning of helper T cell activation and apoptosis by antigen-presenting cells." Cell Signal **16**(8): 939-50.
- Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, et al. (2001). "Partners in transcription: NFAT and AP-1." Oncogene **20**(19): 2476-89.

- Madden, D. R. (1995). "The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes." Annu Rev Immunol **13**: 587-622.
- Maier, R., M. M. Bartolome-Rodriguez, et al. (2000). "Kinetics of CXCR4 and CCR5 up-regulation and human immunodeficiency virus expansion after antigenic stimulation of primary CD4(+) T lymphocytes." Blood **96**(5): 1853-6.
- Majumder, B., N. J. Venkatachari, et al. (2007). "Dendritic cells infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vpr(+) virus induce CD8+ T cell apoptosis via upregulation of TNF alpha." J Virol.
- Marlink, R., P. Kanki, et al. (1994). "Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1." Science **265**(5178): 1587-90.
- Mattson, M. P. and S. L. Chan (2003). "Calcium orchestrates apoptosis." Nat Cell Biol **5**(12): 1041-3.
- McCune, J. M. (2001). "The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease." Nature **410**(6831): 974-9.
- Mehmet, H. (2000). "Caspases find a new place to hide." Nature **403**(6765): 29-30.
- Mehta, K., U. Shahid, et al. (1996). "Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions." Faseb J **10**(12): 1408-17.
- Michel, P., A. T. Balde, et al. (2000). "Reduced immune activation and T cell apoptosis in human immunodeficiency virus type 2 compared with type 1: correlation of T cell apoptosis with beta2 microglobulin concentration and disease evolution." J Infect Dis **181**(1): 64-75.
- Mishra, J. P., S. Mishra, et al. (2005). "Differential involvement of calmodulin-dependent protein kinase II-activated AP-1 and c-Jun N-terminal kinase-activated EGR-1 signaling pathways in tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced CD44 expression in human monocytic cells." J Biol Chem **280**(29): 26825-37.
- Mishra, S., J. P. Mishra, et al. (2005). "Distinct role of calmodulin and calmodulin-dependent protein kinase-II in lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha-mediated suppression of apoptosis and antiapoptotic c-IAP2 gene expression in human monocytic cells." J Biol Chem **280**(45): 37536-46.

- Miyakawa, H., S. K. Woo, et al. (1999). "Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2538-42.
- Mohri, H., A. S. Perelson, et al. (2001). "Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy." J Exp Med **194**(9): 1277-87.
- Molon, B., G. Gri, et al. (2005). "T cell costimulation by chemokine receptors." Nat Immunol **6**(5): 465-71.
- Moore, J. P. (1997). "Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy." Science **276**(5309): 51-2.
- Moore, J. P., A. Trkola, et al. (1997). "Co-receptors for HIV-1 entry." Curr Opin Immunol **9**(4): 551-62.
- Mootha, V. K., M. C. Wei, et al. (2001). "A reversible component of mitochondrial respiratory dysfunction in apoptosis can be rescued by exogenous cytochrome c." Embo J **20**(4): 661-71.
- Morikis, D., A. K. Rizos, et al. (2007). "Electrostatic modeling of peptides derived from the V3-loop of HIV-1 gp120: implications of the interaction with chemokine receptor CCR5." Int J Mol Med **19**(3): 343-51.
- Moriuchi, M. and H. Moriuchi (2003). "YY1 transcription factor down-regulates expression of CCR5, a major coreceptor for HIV-1." J Biol Chem **278**(15): 13003-7.
- Morra, M., M. Zubiaur, et al. (1998). "CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells." Faseb J **12**(7): 581-92.
- Murray, J. M., G. Kaufmann, et al. (1998). "A model of primary HIV-1 infection." Math Biosci **154**(2): 57-85.
- Nabel, G. and D. Baltimore (1987). "An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells." Nature **326**(6114): 711-3.
- Neville, M., F. Stutz, et al. (1997). "The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export." Curr Biol **7**(10): 767-75.

- Nicholson, D. W. (1999). "Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death." Cell Death Differ **6**(11): 1028-42.
- Norrby-Teglund, A., M. Norgren, et al. (1994). "Similar cytokine induction profiles of a novel streptococcal exotoxin, MF, and pyrogenic exotoxins A and B." Infect Immun **62**(9): 3731-8.
- Ohnimus, H., M. Heinkelein, et al. (1997). "Apoptotic cell death upon contact of CD4+ T lymphocytes with HIV glycoprotein-expressing cells is mediated by caspases but bypasses CD95 (Fas/Apo-1) and TNF receptor 1." J Immunol **159**(11): 5246-52.
- Olshevsky, U., E. Helseth, et al. (1990). "Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding." J Virol **64**(12): 5701-7.
- Oppermann, M. (2004). "Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation." Cell Signal **16**(11): 1201-10.
- Oyaizu, N., Y. Adachi, et al. (1997). "Monocytes express Fas ligand upon CD4 cross-linking and induce CD4+ T cells apoptosis: a possible mechanism of bystander cell death in HIV infection." J Immunol **158**(5): 2456-63.
- Oyaizu, N., T. W. McCloskey, et al. (1993). "Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals." Blood **82**(11): 3392-400.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, et al. (1994). "Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection." Immunol Rev **140**: 105-30.
- Parada, C. A. and R. G. Roeder (1996). "Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain." Nature **384**(6607): 375-8.
- Petit, F., D. Arnoult, et al. (2003). "Intrinsic and extrinsic pathways signaling during HIV-1 mediated cell death." Biochimie **85**(8): 795-811.
- Picker, L. J. and D. I. Watkins (2005). "HIV pathogenesis: the first cut is the deepest." Nat Immunol **6**(5): 430-2.

- Porichis, F., Z. Vlata, et al. (2007). "HIV-1 gp120/V3-derived epitopes promote activation-induced cell death to superantigen-stimulated CD4+/CD45RO+ T cells." Immunol Lett **108**(1): 97-102.
- Proft, T. and J. D. Fraser (2003). "Bacterial superantigens." Clin Exp Immunol **133**(3): 299-306.
- Ramratnam, B., S. Bonhoeffer, et al. (1999). "Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis." Lancet **354**(9192): 1782-5.
- Rao, A., C. Luo, et al. (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." Annu Rev Immunol **15**: 707-47.
- Richman, D. D. and S. A. Bozzette (1994). "The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression." J Infect Dis **169**(5): 968-74.
- Roderiquez, G., T. Oravec, et al. (1995). "Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41." J Virol **69**(4): 2233-9.
- Roose, J. and A. Weiss (2000). "T cells: getting a GRP on Ras." Nat Immunol **1**(4): 275-6.
- Rosenberg, E. S., J. M. Billingsley, et al. (1997). "Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia." Science **278**(5342): 1447-50.
- Roumier, T., M. Castedo, et al. (2003). "Mitochondrion-dependent caspase activation by the HIV-1 envelope." Biochem Pharmacol **66**(8): 1321-9.
- Roy, A. M., B. Schweighardt, et al. (2005). "Enhanced replication of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 in CD4(+)CCR5(+)CXCR4(+) T cells." J Acquir Immune Defic Syndr **40**(3): 267-75.
- Rucker, J., M. Samson, et al. (1996). "Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity." Cell **87**(3): 437-46.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 10964-7.

- Savarino, A., F. Bottarel, et al. (2000). "Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions?" Aids **14**(9): 1079-89.
- Savarino, A., L. Calosso, et al. (1999). "Modulation of surface transferrin receptors in lymphoid cells de novo infected with human immunodeficiency virus type-1." Cell Biochem Funct **17**(1): 47-55.
- Schacker, T. W., P. L. Nguyen, et al. (2002). "Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis." J Clin Invest **110**(8): 1133-9.
- Schaeffer, E. M., J. Debnath, et al. (1999). "Requirement for Tec kinases Rlk and Itk in T cell receptor signaling and immunity." Science **284**(5414): 638-41.
- Schimpl, A., I. Berberich, et al. (2002). "IL-2 and autoimmune disease." Cytokine Growth Factor Rev **13**(4-5): 369-78.
- Schmitz, I., A. Krueger, et al. (2003). "An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death." J Immunol **171**(6): 2930-6.
- Schreiber, R. (2005). "Ca²⁺ signaling, intracellular pH and cell volume in cell proliferation." J Membr Biol **205**(3): 129-37.
- Schuitemaker, H., M. Koot, et al. (1992). "Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population." J Virol **66**(3): 1354-60.
- Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, et al. (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." Eur J Biochem **254**(3): 439-59.
- Sempowski, G. D., C. B. Hicks, et al. (2005). "Naive T cells are maintained in the periphery during the first 3 months of acute HIV-1 infection: implications for analysis of thymus function." J Clin Immunol **25**(5): 462-72.
- Sereti, I., B. Herpin, et al. (2001). "CD4 T cell expansions are associated with increased apoptosis rates of T lymphocytes during IL-2 cycles in HIV infected patients." Aids **15**(14): 1765-75.
- Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, et al. (2004). "NFAT and NF-kappaB factors-the distant relatives." Int J Biochem Cell Biol **36**(7): 1166-70.

- Shattock, R. J. and J. P. Moore (2003). "Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection." Nat Rev Microbiol **1**(1): 25-34.
- Shaw, A. S. and M. L. Dustin (1997). "Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation." Immunity **6**(4): 361-9.
- Siegel, R. M., J. K. Frederiksen, et al. (2000). "Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations." Science **288**(5475): 2354-7.
- Simon, V. and D. D. Ho (2003). "HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy." Nat Rev Microbiol **1**(3): 181-90.
- Sloand, E. M., N. S. Young, et al. (1997). "Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication." Blood **89**(4): 1357-63.
- Steller, H. (1995). "Mechanisms and genes of cellular suicide." Science **267**(5203): 1445-9.
- Stone, A. (2002). "Microbicides: a new approach to preventing HIV and other sexually transmitted infections." Nat Rev Drug Discov **1**(12): 977-85.
- Strebel, K. (2003). "Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev." Aids **17 Suppl 4**: S25-34.
- Sullivan, N., Y. Sun, et al. (1998). "CD4-Induced conformational changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization." J Virol **72**(6): 4694-703.
- Tantillo, C., J. Ding, et al. (1994). "Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance." J Mol Biol **243**(3): 369-87.
- Timmerman, L. A., N. A. Clipstone, et al. (1996). "Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression." Nature **383**(6603): 837-40.
- Tong, E. H., J. J. Guo, et al. (2006). "Regulation of nucleocytoplasmic trafficking of transcription factor OREBP/TonEBP/NFAT5." J Biol Chem **281**(33): 23870-9.

- Trama, J., Q. Lu, et al. (2000). "The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner." J Immunol **165**(9): 4884-94.
- Tritel, M. and M. D. Resh (2001). "The late stage of human immunodeficiency virus type 1 assembly is an energy-dependent process." J Virol **75**(12): 5473-81.
- Ullrich, R., W. Schmidt, et al. (1998). "Mucosal HIV infection." Pathobiology **66**(3-4): 145-50.
- Unutmaz, D., P. Pileri, et al. (1994). "Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination." J Exp Med **180**(3): 1159-64.
- van't Wout, A. B., N. A. Kootstra, et al. (1994). "Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission." J Clin Invest **94**(5): 2060-7.
- van Leeuwen, J. E. and L. E. Samelson (1999). "T cell antigen-receptor signal transduction." Curr Opin Immunol **11**(3): 242-8.
- Vermes, I., C. Haanen, et al. (2000). "Flow cytometry of apoptotic cell death." J Immunol Methods **243**(1-2): 167-90.
- Viola, A., R. L. Contento, et al. (2006). "T cells and their partners: The chemokine dating agency." Trends Immunol **27**(9): 421-7.
- Viola, A. and A. Lanzavecchia (1996). "T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds." Science **273**(5271): 104-6.
- Wang, J. K., B. Zhu, et al. (1997). "CD4+ T cells reactivated with superantigen are both more sensitive to FasL-mediated killing and express a higher level of FasL." Cell Immunol **179**(2): 153-64.
- Wei, P., M. E. Garber, et al. (1998). "A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA." Cell **92**(4): 451-62.
- Weissenhorn, W., A. Dessen, et al. (1997). "Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41." Nature **387**(6631): 426-30.
- White, J., A. Herman, et al. (1989). "The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice." Cell **56**(1): 27-35.

- Wolthers, K. C., H. Schuitemaker, et al. (1998). "Rapid CD4+ T-cell turnover in HIV-1 infection: a paradigm revisited." Immunol Today **19**(1): 44-8.
- Woods, A., K. Dickerson, et al. (2005). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells." Cell Metab **2**(1): 21-33.
- Wu, Y. and J. W. Marsh (2003). "Gene transcription in HIV infection." Microbes Infect **5**(11): 1023-7.
- Yamasaki, S., M. Tachibana, et al. (1997). "Lck-independent triggering of T-cell antigen receptor signal transduction by staphylococcal enterotoxins." J Biol Chem **272**(23): 14787-91.
- Yang, X., M. Farzan, et al. (2000). "Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins." J Virol **74**(12): 5716-25.
- Yang, Y. F., M. Tomura, et al. (2001). "IL-12 as well as IL-2 upregulates CCR5 expression on T cell receptor-triggered human CD4+ and CD8+ T cells." J Clin Immunol **21**(2): 116-25.
- Yedavalli, V. S., H. M. Shih, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1." J Virol **79**(21): 13735-46.
- Zafiroopoulos, A., S. Baritaki, et al. (2001). "V3 induces in human normal cell populations an accelerated macrophage-mediated proliferation--apoptosis phenomenon of effector T cells when they respond to their cognate antigen." Biochem Biophys Res Commun **281**(1): 63-70.
- Zafiroopoulos, A., S. Baritaki, et al. (2001). "Dys-regulation of effector CD4+ T cell function by the V3 domain of the HIV-1 gp120 during antigen presentation." Biochem Biophys Res Commun **284**(4): 875-9.
- Zapor, M. J., K. L. Cozza, et al. (2004). "Antiretrovirals, Part II: focus on non-protease inhibitor antiretrovirals (NRTIs, NNRTIs, and fusion inhibitors)." Psychosomatics **45**(6): 524-35.
- Zheng, L., G. Fisher, et al. (1995). "Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor." Nature **377**(6547): 348-51.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΠΟΡΙΧΗΣ ΦΙΛΙΠΠΟΣ

ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΡΟΣ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ

ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ

Ελληνική

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ
ΓΕΝΝΗΣΗΣ

23 ΜΑΙΟΥ 1981

ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ

Τομέας Εφαρμοσμένης Βιοχημείας και Ανοσολογίας
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, ΙΤΕ
Βασιλικά, Βουτών, Ηράκλειο, τκ 71110
Κρήτη.
Τηλ. 6948272762
Fax: 2810 391101

EMAIL

porichis@imbb.forth.gr

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1996

Πτυχίο Αγγλικών: Lower Certificate of Cambridge. Βαθμός (B)

1996- 1999

Λύκειο Μύρινας Λήμνου. Βαθμός 19.5/20 (A)

1999-2002

Πτυχίο bachelor (BSc) στις Βιοιατρικές Επιστήμες,
School of Pharmacy and Biomedical Sciences, Πανεπιστήμιο του
Πόρτσμουθ, Αγγλία

2002-2003

**Μεταπτυχιακός Τίτλος Ειδίκευσης (MSc) στις Βιοιατρικές
Επιστήμες,**
School of Pharmacy and Biomedical Sciences, Πανεπιστήμιο του
Πόρτσμουθ, Αγγλία

2003-

**Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής με τίτλο ‘Μελέτη των
μηχανισμών παθογένεσης του ιού HIV-1’**
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστήμιο Κρήτης

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ
ΚΑΤΑΡΤΗΣΗ**

Πτυχιακή εργασία με τίτλο: ‘Optimization of the expression of Poly-C-
Binding protein 2 (PCBP2)’

Μεταπτυχιακό Τίτλο Ειδίκευσης με τίτλο ‘Investigation of the
interaction of IL-17 with milk protein (MARVEL) and Heparin’

**ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ**

- [1] E. Krambovitis, **F. Porichis**, and D. A. Spandidos, HIV entry inhibitors: a new generation of antiretroviral drugs, *Acta Pharmacol Sin* 26 (2005) 1165-1173.
- [2] Z. Vlata, **F. Porichis**, G. Tzanakakis, A. Tsatsakis, and E. Krambovitis. In vitro cytopathic effects of mycotoxin T-2 on human peripheral blood T lymphocytes, *Toxicol Lett* 160 (2005) 60-68.
- [3] G. Soufla, **F. Porichis**, G. Sourvinos, S. Vassilaros, and D. A. Spandidos, Transcriptional deregulation of VEGF, FGF2, TGF-beta1, 2, 3 and cognate receptors in breast tumorigenesis, *Cancer Lett* 235 (2006) 100-113.
- [4] Z. Vlata, **F. Porichis**, G. Tzanakakis, A. Tsatsakis, E. Krambovitis. A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol Lett* 165 (2006) 274-281
- [5] **F. Porichis**, Z. Vlata, G. Hatzidakis, D. A. Spandidos, E. Krambovitis. HIV-1 gp120/V3-derived epitopes promote activation-induced cell death to superantigen-stimulated CD4⁺/CD45RO⁺ T cells. *Immunol Lett*, 108 (2007) 97-102

**ΣΥΜΕΤΟΧΗ ΣΕ
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ
ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

- G. Soufla, **F. Porichis**, G. Sourvinos, S. Vassilaros, D.A. Spandidos. Evaluation of VEGF, FGF2, and TGFβ1 mRNA expression levels in breast cancer: Transcriptional inactivation of TGFβ1 and FGF2 correlates with tumor progression. 9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular Medicine. Heraklion, Greece, 13-15 October 2004
- G. Soufla, **F. Porichis**, S. Sifakis and D.A. Spandidos. Post-transcriptional regulation of TGF-β1 in endometrial cancer. 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine. Heraklion, Greece, 13-15 October 2005
- F. Porichis**, S. Baritaki, D.A. Spandidos _E. Krambovitis. The use of superantigens for the study of HIV gp120/V3-mediated biological events in CD4⁺ T lymphocytes. 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine. Heraklion, Greece, 13-15 October 2005
- E. Krambovitis, **F. Porichis**, Z. Vlata, S. Baritaki, D.A. Spandidos Evidence for the ionic nature of the HIV-1 gp120/V3 interaction with CCR5 that affects biological events in T lymphocytes. 10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine. Heraklion, Greece, 13-15 October 2005

E. Krambovitis, **F. Porichis**, Z. Vlata, A. K. Rizos. Cationic peptides can influence cell events via simple electrostatic interactions: the V3 - CCR5 paradigm in human T lymphocytes. *5th International Discussion Meeting on Relaxations in Complex Systems*, 7-13 July 2005, Lille, France

F. Porichis, Z. Vlata, A. Zafiropoulos, D. Spandidos, E. Krambovitis. Induction of a V3-mediated phenomenon during pseudo antigen presentation; implication in HIV pathogenesis ENII-MUGEN Immunology Summer School, Sardinia, Italy, 13-20 May, 2006

F. Porichis, Z. Vlata, A. Zafiropoulos, D. Spandidos, E. Krambovitis. HIV-1 V3-MEDIATED ACTIVATION INDUCED CELL DEATH (AICD) OF CD4 T LYMPHOCYTES DURING PSEUDO ANTIGEN PRESENTATION. 16th European Congress of Immunology – ECI and 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology. **PB-3488** Paris France, 6-9 September 2006

F. Porichis, Z. Vlata, S. Baritaki, D.A. Spandidos, E. Krambovitis. HIV-1 gp120/V3 promotes activation-induced cell death to CD4⁺ T lymphocytes during antigen presentation. 11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine. Heraklion, Greece, 12-14 October 2006

F. Porichis, Z. Vlata, A. Zafiropoulos, G. Tzanakakis, D.A. Spandidos, E. Krambovitis. Evidence of ionic interactions between HIV-1 V3 peptides and chemokine receptors. 11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine. Heraklion, Greece, 12-14 October 2006

G. Soufla, **F. Porichis**, S. Sifakis, E. Koumantakis, D.A. Spandidos Association of YY1 and *ras* genes' mRNA with angiogenesis-related growth factors in endometrial cancer. 11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine. Heraklion, Greece, 12-14 October 2006

Organizing Committee

9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular Medicine. Heraklion, Greece, 13-15 October 2004

10th World Congress on Advances in Oncology and 8th International Symposium on Molecular Medicine. Heraklion, Greece, 13-15 October 2005

11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine. Heraklion, Greece, 12-14 October 2006

HIV-1 gp120/V3-derived epitopes promote activation-induced cell death to superantigen-stimulated CD4⁺/CD45RO⁺ T cells

Filippos Porichis^{a,c}, Zaharenia Vlata^a, George Hatzidakis^a,
Demetrios A. Spandidos^c, Elias Krambovitis^{a,b,*}

^a Department of Applied Biochemistry and Immunology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology,
Vassilika Vouton, Heraklion, Crete, Greece

^b Department of Veterinary Medicine, University of Thessaly, Karditsa, Thessaly, Greece

^c Department of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

Received 29 September 2006; received in revised form 3 November 2006; accepted 5 November 2006
Available online 27 November 2006

Abstract

The third hypervariable (V3) domain of the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 has been implicated in HIV pathogenesis via co-receptor usage of chemokine receptors CCR5 and CXCR4. As the protagonist cell populations in the asymptomatic phase of HIV-1 infection are infected macrophages and effector/memory (CD45RO⁺) CD4⁺ T cells that express CCR5, we established an in vitro model using human primary monocyte-derived macrophages and lymphocytes to investigate the role of V3 in affecting antigen presentation. We used staphylococcal enterotoxin A (SEA) as a superantigen at a low concentration of 1 ng/ml, to activate naïve CD4⁺ T cells. Exposure of cells to SEA and lipoV3-liposomes increased the percentage of CD4⁺/CD45RO⁺/CCR5⁺ T cell population as compared to cells treated with SEA and plain liposomes. A consequent decrease of the percentage of CD4⁺/CD45RO⁺/CXCR4⁺ subset was observed. The V3-mediated activation was competitively inhibited by soluble V3-derived peptides with higher cationic charge. V3 enhanced also apoptosis as demonstrated by flow cytometry and intracellular calcium ion assays. These results reinforce the postulation that V3 alters the antigen presentation function itself, independent of specific antigens, thus leading to an enhanced activation-induced cell death (AICD) of responding T cells.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: AICD; CCR5; Liposomes; SEA; T cells

1. Introduction

HIV infection is characterized by the gradual loss of CD4⁺ T cells that leads to the development of AIDS [1–3]. Although the precise mechanism of CD4⁺ T cell depletion is still under debate [4–6], loss of immune function is associated with the disappearance of uninfected effector/memory (CD45RO⁺) CD4⁺ T cells [7,8]. Several viral components have been implicated in HIV pathogenesis [9–12], the envelope glycoprotein gp120 is, however, considered to play a key role in the depletion of CD4⁺ T cells [13,14]. As the gp120 is directly involved in the process of viral cell entry, strategies for interfering with the func-

tion of gp120 are actively being formulated and exploited for therapeutic applications [15].

As HIV preferentially infects activated CD4 T cells [16,17], and the basic function of these cells is to interact with antigen presenting cells, we have previously shown deregulation of the antigen presenting process by HIV-1 envelope components [18,19]. The third variable domain (V3) of the glycoprotein gp120, when present on the surface of a macrophage, appears to interact at least with the chemokine receptor CCR5 [20] of a responding CD45RO⁺/CD4⁺ T cell delivering an enhanced activation-induced cell death (AICD) signal [21]. These observations were made by using tetanus toxin as a specific recall antigen and exploiting the residual tetanus T cell memory population. The experiments, therefore, required peripheral blood lymphocytes from tetanus-vaccinated donors, and with an anticipated frequency of only one tetanus toxin memory CD4⁺ cell in 10⁵–10⁶ T cells.

* Corresponding author at: Department of Applied Biochemistry and Immunology, IMBB, FORTH, P.O. Box 1527, Heraklion 711 10, Crete, Greece. Tel.: +30 81 391020; fax: +30 81 391101.

E-mail address: krambo@imbb.forth.gr (E. Krambovitis).

Although the tetanus toxin approach was sufficient to demonstrate interference of the antigen presentation process by V3, the low frequency of the responding CD4⁺ cells constituted a limitation in the application of this system for the study of other functional aspects of the immune deregulation such as intracellular signaling. In order to overcome this problem, we elected to use a superantigen that is reported to activate up to 25% of naïve T cells [22,23] via a general pseudo antigen presentation mode. In the present investigation, we used the staphylococcal enterotoxin A (SEA) as a superantigen and liposomes bearing a synthetic V3 lipopeptide [24], to provide further evidence that V3 induces AICD during antigen presentation. Proliferation and apoptosis measurements indicated, indeed, that V3 on the membrane of macrophages induced activation of T cells followed by apoptosis. Intracellular calcium levels were also increased at time points where apoptosis reached maximum values, supporting the apoptotic observations. Flow cytometric analysis confirmed that the main population affected by the V3 lipopeptide was the CD4⁺/CD45RO⁺/CCR5⁺ T cells. Finally, the V3 AICD phenomenon was inhibited by free V3 peptides with higher cationic charges.

2. Materials and methods

2.1. Peptides and liposomes

The HIV-1 gp120/V3 peptide RKSIRIQRGPGRAFVY (LAI strain, a.a. 304–318) and two variations derived from LAI peptide sequence containing amino acid substitutions, with one (V3LAI⁺¹ VGSILIQRGPGAAFY) and nine basic amino acids (V3LAI⁺⁹ RKSIRRRPQRKAKY) were synthesized using the *F-moc*tBu chemistry [25]. Lipopeptides were produced by covalent binding of serine-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2*RS*)-propyl]-*n*-palmitoyl-(*R*)cysteine (Boehringer–Mannheim Biochemica, Germany) to the V3 LAI peptide, according to the manufacturer's instructions. Liposomes were constructed by the dehydration–rehydration method and were reconstituted with 100 µl distilled water. Non-entrapped material was removed by washing with phosphate buffered saline (PBS) [19].

2.2. Cell isolation

Buffy coats were obtained from healthy, HIV-1 sera-negative blood donors from Venizelio Hospital Blood Transfusion Service, Heraklion, Crete. Informed consent was obtained from all the participating volunteers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using ficoll-paque (Amersham–Pharmacia, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's protocol and were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with antibiotics and 5% human serum [24]. Separation of CD4⁺ T cells was carried out with the magnetic cells sorting (MACS) system (Myltenil Biotech, Germany) using the CD4⁺ T cell isolation kit, according to the manufacturer's protocol. 5×10^5 CD4⁺ T cells were co-cultured with monocytes isolated from 10⁶ PBMCs of the same donor by selective adherence to the solid phase.

2.3. Proliferation assay

For proliferation assays, 10⁶ PBMCs/ml were cultured in 96-well plates (Costar) in RPMI-1640, containing 5% human serum and the appropriate liposome formulation. One nanogram per millilitre of staphylococcal enterotoxin A (Sigma–Aldrich Chemical Co.) was added into the wells on day 3. At preferred time period cells were harvested after a pulse period of 18 h with ³H-thymidine (Amersham, UK). Counts per minute of each sample were measured in a LS1701 beta counter (Beckman, USA). For inhibition experiments 50 ng/ml of peptides with one (V3LAI⁺¹) and nine basic amino acids (V3LAI⁺⁹) were used.

2.4. Phenotypic analysis of T cells by flow cytometry

In order to perform phenotypic analysis of T cells, 10⁶ PBMCs/ml were cultured in 24-well plates (Costar) in RPMI-1640, containing 5% human serum and the appropriate liposome formulation. One nanogram per millilitre SEA was added in the cultures on day 3 of the experiment. Analysis was performed on day 7 of the experiment. Cells were centrifuged at 1300 rpm for 10 min at 25 °C and were resuspended in 100 µl cold PBS supplemented with 2% inactivated foetal calf serum (GIBCO), pH 7.4. They were incubated for 20 min on ice with 20 µl of fluorochrome-labelled antibodies: CD45RO-FITC (Mouse IgG2a,κ, UCHL1), CXCR4-PE (Mouse IgG2a,κ, 12G5), CCR5-PE (Mouse IgG2a,κ, 2D7/CCR5), CD4 PE-Cy5 (Mouse IgG1,κ, RPA-T4) from BD Pharmingen. After two washes with cold PBS, the pellet was resuspended in 500 µl PBS and the cells were analysed immediately by FACS (Callibur, Becton–Dickinson, US) using the CELLQuest programme.

2.5. Measurements of cell apoptosis

For the estimation of cell apoptosis, 1×10^6 cells were collected at preferred time period (days 3, 5, 7, 9, 11 and 13) and washed with 10 mM phosphate buffered saline, pH 7.4. The cell pellet was resuspended in 100 µl annexin V-fluos (Boehringer–Mannheim Biochemica) labelling solution (10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl and 5 mM CaCl₂ in pH 7.4) containing 2 µl annexin-V-fluos labelling reagent and 2 µl of 50 µg/ml propidium iodide solution (ICN Biomedicals Inc.), and incubated at room temperature for 15 min. Four hundred microlitre incubation buffer was added to each tube and apoptosis was analysed immediately by FACS (Callibur) using the CELLQuest programme.

2.6. Intracellular calcium measurements

For intracellular calcium measurements, 1×10^6 PBMCs were collected at preferred time period (days 3, 5, 7, 9, 11 and 13) and after centrifugation at 1300 rpm they were resuspended in RPMI-1640 supplemented with 2% FBS and 4 µM FLUO-3 acetoxymethylester (Molecular Probes, USA). Cells were incubated at room temperature for 45 min and during this period were also stained with CD4 PE-Cy5 (Mouse IgG1,κ, RPA-T4). Cells were washed twice with Hank's balanced solution (containing 20 mM HEPES and 0.2% bovine serum albumin, pH 7.4). After

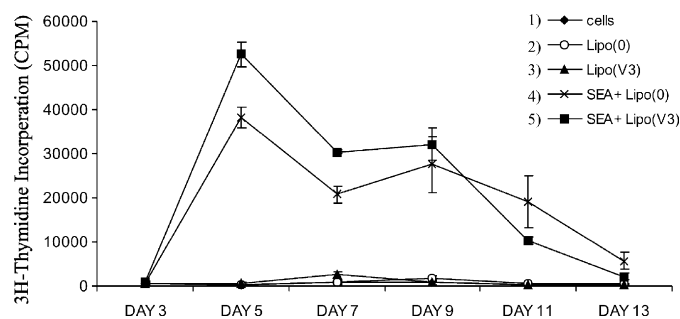


Fig. 1. Proliferation of peripheral blood mononuclear cells cultured with different liposome constructs in the presence or absence of 1 ng/ml SEA. (1) PBMC, (2) PBMC treated with plain liposomes, (3) PBMC treated with lipoV3-liposomes, (4) PBMC treated with SEA and plain liposomes and (5) PBMC treated with SEA and lipoV3-liposomes. Values represent the mean (\pm S.D.) value from three independent experiments on three different donors.

the final wash cells were incubated for a further 10 min at room temperature and then analysed by FACS (Callibur).

3. Results

3.1. Proliferation of PBMC treated with SEA and liposome constructs

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from 10 healthy blood donors for the antigen presentation studies. The PBMC were exposed for 3 days to liposome constructs, pulsed with 1 ng/ml SEA and their proliferation/cell death behaviour were followed for up to 13 days.

PBMC stimulated with SEA gave strong proliferative responses, as expected, whereas unstimulated cells did not. The presence of SEA and lipoV3-liposomes induced greater proliferation on PBMC as compared with cells exposed to SEA and plain liposomes (Fig. 1), that was statistically significant ($p < 0.0001$, paired samples t -test, SPSS programme). We further investigated the specificity of the lipoV3-liposome effect on PBMCs by competitive inhibition assays using V3 peptides with higher (V3LAI⁺⁹) and lower (V3LAI⁺¹) cationic strength. Fifty nanograms per millilitre of the peptides were added 6 h before SEA stimulation on day 3. The results (Fig. 2) showed that V3LAI⁺⁹ inhibited the lipoV3-liposome proliferation. Both peptides had no effect on the proliferation of cells treated with plain liposomes and pulsed with the superantigen (data not shown).

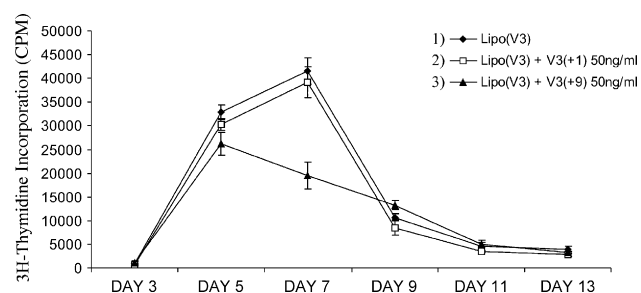


Fig. 2. Inhibition experiments using 50 ng/ml soluble V3-derived peptides with one or nine positively charged amino acids on PBMC treated with V3 bearing liposomes and 1 ng/ml SEA. (1) PBMC treated with SEA and lipoV3-liposomes, (2) PBMC treated with SEA, lipoV3-liposomes and 50 ng/ml V3⁺¹ soluble peptides and (3) lipoV3-liposomes and 50 ng/ml V3⁺⁹ soluble peptides. Values represent the mean (\pm S.D.) value from three biological replicates of the same donor.

3.2. Phenotypic analysis of the CD4⁺ T lymphocytes on the day of maximum proliferation

Phenotypic analysis of CD4⁺ T cells was performed after SEA stimulation of PBMCs to determine the subpopulation changes. CD4⁺ T cells were isolated by negative selection using magnetic cell sorting and co-incubated with macrophages that were isolated by selective adherence to the solid phase. Measurements by flow cytometry were done on the day of maximum proliferation. The use of SEA with lipoV3-liposomes increased the percentage of CD4⁺/CD45RO⁺/CCR5⁺ subpopulation to 37.24%, while SEA with plain liposomes to 24.63% (Fig. 3A). The CD4⁺/CD45RO⁺/CXCR4⁺ subpopulation showed a consequent reduction. From the percentage normalization of the cell populations (Fig. 3B), it arose that SEA and plain liposomes increased the CCR5/CXCR4 double positive (10.82%) and the CCR5 positive (13.74%) CD4⁺ T cells. The use of SEA with lipoV3-liposomes resulted in higher CCR5⁺ subpopulations (16.11%) and CCR5/CXCR4 double positive subpopulations (21.13%).

3.3. Apoptosis and intracellular calcium levels ($[Ca^{2+}]_i$) in PBMCs treated with SEA and liposome constructs

The apoptotic profile in the lymphatic population after stimulation of PBMCs with SEA and lipoV3-liposomes showed increased apoptosis as compared with SEA and plain lipo-

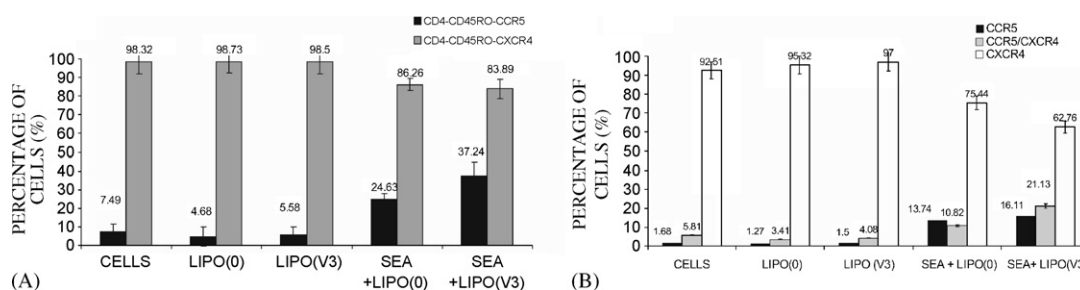


Fig. 3. (A) Chemokine receptor phenotypic analysis of CD4⁺/CD45RO⁺ T cells using flow cytometry. (B) Percentage normalization of the CD4⁺/CD45RO⁺ subpopulation. CD4⁺ T cell were isolated using magnetic cells sorting (MACS) and were co-cultured with monocytes isolated from 10⁶ PBMC's by selective adherence to the solid phase. Measurements were performed on day 7 of the experiment. Values represent the mean (\pm S.D.) value from three independent experiments on three different donors.

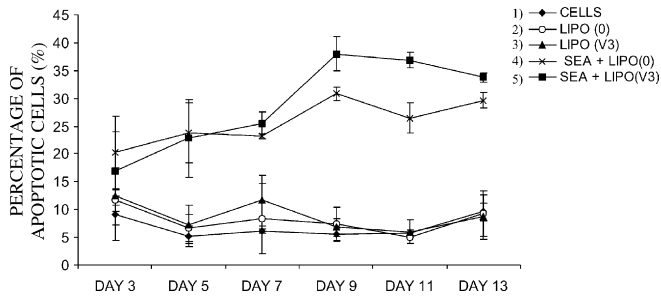


Fig. 4. Kinetic apoptosis measurements of PBMC cultured with different liposome constructs and stimulated with 1 ng/ml SEA. Cells were stained with annexin-V fluo and propidium iodide, and analysed by flow cytometry. (1) PBMC, (2) PBMC treated with plain liposomes, (3) PBMC treated with lipoV3-liposomes, (4) PBMC treated with SEA and plain liposomes and (5) PBMC treated with SEA and lipoV3-liposomes. Values represent the mean (\pm S.D.) value from three independent experiments on three different donors.

somes, that was statistically significant ($p=0.0173$, $n=5$, paired samples t -test, SPSS programme). As anticipated, FACS analysis (Fig. 4) showed an inverse relationship between apoptosis and proliferation, apoptosis being more distinct with the SEA/lipoV3-liposome-treated cells.

We further investigated the apoptotic effects of V3 by measuring intracellular calcium levels in the lymphatic population using Fluo-3/AM. The results (Fig. 5) showed an increase in intracellular calcium levels in the cells treated with SEA/lipoV3-liposomes as compared with cells treated SEA with plain liposomes or SEA alone. This difference was observed on days 9, 11 and 13 where maximum apoptosis was also observed.

4. Discussion

HIV infection induces a gradual decline of the patient peripheral blood CD4⁺ T cell subpopulation during the asymptomatic phase that subsequently leads to AIDS. The precise mechanism by which the virus depletes CD4⁺ T cells is still under debate [17,26–28]. Using tetanus toxin as a recall antigen, we have shown previously that during the process of antigen presentation the V3 domain of the viral gp120 interacts, at least, with the target T cell CCR5 that leads to an enhanced and accelerated AICD. During the asymptomatic phase of HIV infection, the predominant R5 HIV variants infect CD4⁺ T cells via infected macrophages which recruit memory/effector CD4⁺ T cells, characterized by containing CCR5 as their main chemokine receptor.

At the symptomatic phase, X4 HIV variants infect directly naïve (CXCR4⁺) CD4⁺ T cells and are less dependent on immune function.

A limitation of our human in vitro model in previous studies was the dependence of donor PBMC on sufficient T cell memory for the recall antigen (tetanus toxin). We developed an alternative in vitro system that would be independent of specific antigens. Here we employed SEA to activate PBMC after a 3-day expose to appropriate liposomes with V3 epitopes to compare and match the effects in relation to specific antigen presentation.

SEA is a superantigen that binds non-specifically the class II major histocompatibility complex outside the peptide binding groove and the variable region of the TCR β -chain [29–33]. This pseudo antigen presentation results in activation of up to 25% of naïve T cells compared to 1 in 10^5 – 10^6 that are activated during antigen specific presentation [22,23]. In our experiments, addition of SEA to the cultures activated strong proliferation of PBMC, as expected. Cells treated with SEA and lipoV3-liposomes showed greater proliferation as compared to cells with SEA and plain liposomes. These results indicated that the V3 phenomenon was not restricted to specific antigens and suggested a generalized phenomenon that implicated a TcR-triggered activation of T cells. It is worth noting that we used relatively low concentrations of SEA (1 ng/ml) in order to demonstrate the effects of V3.

To further verify the V3 phenomenon in SEA-activated PBMC, we performed competitive inhibition assays. We had shown previously with peptide–peptide V3–CCR5 interactions [21] that the amino terminal domain of CCR5 interacted with the V3 domain [34,35]. Using lipoV3-liposomes with five positive amino acid residues (LAI V3), we performed inhibition experiments with soluble V3 peptide derivatives that contained one (V3⁺¹) or nine (V3⁺⁹) positively charged amino acids. The greater efficacy with which the free V3⁺⁹ inhibited the lipoV3-induced phenomenon than the V3⁺¹ confirmed that the enhanced proliferation was attributed to the V3 domain. This observation further supported the supposition of the ionic nature of the V3–CCR5 interaction and the potential application of positively charged peptides as inhibitors of HIV infection and enhanced apoptosis of CD4 T cells [36].

We investigated the changes in the CD4⁺ T cell subsets by SEA-induced antigen presentation in the presence of lipoV3-liposomes. Using magnetic negative sorting of CD4⁺ T cells co-incubated with monocyte-derived macrophages and SEA, we

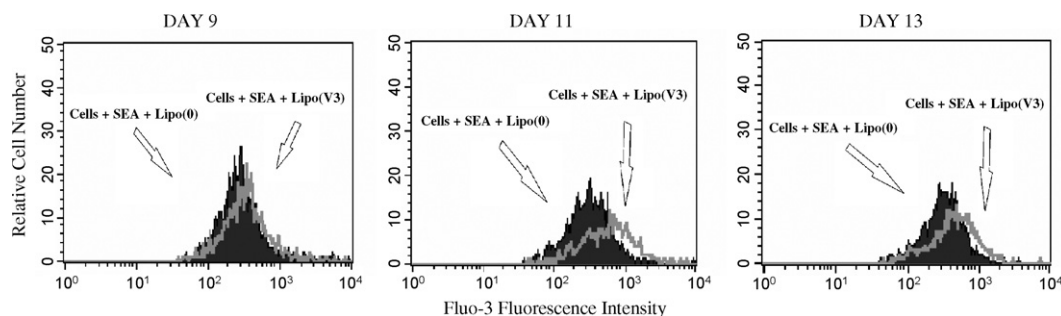


Fig. 5. Intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) levels in PBMC exposed to plain or lipoV3-liposomes and stimulated with SEA. Measurements were made using FLUO-3AM and analysed by flow cytometry.

showed that the main CD4⁺ T cell population affected was the CD4⁺/CD45RO⁺/CCR5⁺ subset. The increase was evident with SEA and lipoV3-liposomes (37.2%), and less pronounced with SEA and plain liposomes (24.36%). This observation together with the proliferation results indicates that SEA and lipoV3-liposomes favour the activation of the CD4⁺/CD45RO⁺/CCR5⁺ subset. It is worth noting that approximately 20% of the CCR5⁺ T cells were CCR5⁺/CXCR4⁺ double positive. It is accepted that CXCR4 is mainly expressed on naïve CD4 T cells and CCR5 on effector/memory T cells [37,38]. The presence of double positive CCR5⁺/CXCR4⁺ CD4 T cells has been previously reported with the remark that the majority of CCR5⁺ T cells co-express CXCR4 [39]. Indeed, it has been postulated that the co-existence of CXCR4 and CCR5 on T cells may represent a transient state from naïve to activated T cells. The reduction of the CD4⁺/CD45RO⁺/CXCR4⁺ subset and the increase of the CD4⁺CD45RO⁺CCR5⁺ T cells by SEA and liposomes indicate in our experiments that they induce an overall activation of CD4⁺ T cells.

Measurements on cell death showed that lipoV3-liposomes induced greater apoptosis than plain liposomes, which peaked on days 9, 11 and 13. Our observations of increased apoptosis by SEA agree with previous reports [33,40]. Apoptosis was inversely related to proliferation, as expected. In the same context, increase of intracellular calcium levels on the CD4⁺ subpopulation accompanied the decrease of cell numbers, on days 9, 11 and 13. Intracellular calcium levels have been implicated in T cell functions such as cytokine production, proliferation and activation-induced cell death [41–43]. The balance between proliferation and apoptosis is very fragile and although increase of intracellular calcium is required for cell proliferation, sustained increase may generate activation-induced cell death [44,45]. In support of our findings, there is strong evidence that T cells from HIV infected patients undergo activation-induced cell death by the persistent activation from the infection [46–48]. The above results indicate that during antigen presentation the V3 domain is capable of causing activation-induced cell death to T cells, as we reported previously [18,19].

A possible mechanism of the sustained T cell activation is believed to be the recently characterized phenomenon by Molon et al. [49]. Although previous studies from our group on V3 have described a possible involvement of CCR5-induced signaling during antigen presentation [21], Molon et al. [49] produced evidence on the importance of chemokine receptors during antigen presentation. They postulated that CCR5 receptors are recruited through a G_i-independent mechanism to the immune synapse resulting in a stronger T cell-APC attraction and induce greater proliferating responses of T cells. The present study, along with previous studies from our group, suggests that during antigen presentation, the V3 on the plasma membrane of macrophages interacts at least with the CCR5 of activated T cells and produces enhanced proliferation followed by sharp apoptosis [21,50]. Interaction of V3 with CCR5 is stable because of the position of the V3 and gp120 on the macrophage membrane that sustains the signals to CCR5 and may result in persistent activation of the responding T cells, thus leading them to activation-induced cell death.

Host cell proteins such as MHC class II proteins are incorporated on the HIV-1 viral envelope that preserve also their functionality [51,52]. Viral particles are, therefore, capable of presenting antigens to T cells via these MHC class II proteins causing AICD. This notion is supported by the observations of Holm and Gabuzda [53] and explains the maximal levels of activation and apoptosis that were reported when virions had incorporated MHC class II and B7-2 proteins to their viral envelope [53]. HIV-1 preferentially infects activated cells as the host cell machinery favours viral replication [54,55]. HIV-1 components such as the Nef within the infected cell inhibit the cell from going to apoptosis [56–58]. Considering that only 1 in 10,000 viral particles are actually infective [59], it is conceivable that HIV-1 exploits the antigen presentation process for infecting CD4⁺ T cells, and the V3 domain ensures the activated state of these cells. If infection is not achieved the responding cells are condemned to AICD [21,50].

In conclusion, by replacing recall antigens with superantigens in antigen presentation, we provided further supporting evidence that the pathogenic effects of V3 are related to deregulation of antigen presentation function that results in “hyper” activation of CD4⁺ T cells and subsequent enhanced activation-induced cell death. The main lymphocyte population affected is the effector/memory (CD45RO⁺) CD4⁺ T cells that also express CCR5 on their surface. These results are in line with the *in vivo* situation. In addition, with the use of the superantigen we were able to overcome the inherent limitations of tetanus toxin presentation and showed that the V3 phenomenon can also be observed in generalized antigen presentation systems. Competitive inhibition of the V3 phenomenon by more cationic V3-like peptides verified the ionic nature of the V3–CCR5 interaction. Although our results refer to an *in vitro* model of V3–CCR5 interactions, it could be speculated that the biological relevance of this phenomenon may be related to the observed AICD of uninfected CD4⁺ T cells. Our proposed model may also explain the early loss of HIV-specific CD4 T cell function that has been observed during HIV infection [60,61]. HIV antigens are abundant in the body, and HIV-specific CD4 T cells have more chances of recognizing HIV antigens and thus undergo V3-mediated AICD. Our *in vitro* system, also, overcomes some key restrictions by the use of animal models as it utilizes human primary cells and it can provide information on the interactions between HIV-1 envelope components and immune cells at a molecular level.

Acknowledgement

The project was financially supported by the General Secretariat for Research and Technology, Greece, grant 4.5.1-SP-YB/31(2003).

References

- [1] Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via CS, et al. *J Clin Invest* 1989;84:1892–9.
- [2] McCune JM. *Nature* 2001;410:974–9.
- [3] Mohri H, Perelson AS, Tung K, Ribeiro RM, Ramratnam B, Markowitz M, et al. *J Exp Med* 2001;194:1277–87.

- [4] Roumier T, Castedo M, Perfettini JL, Andreau K, Metivier D, Zamzami N, et al. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1321–9.
- [5] Dockrell DH, Badley AD, Algeciras-Schimmich A, Simpson M, Schut R, Lynch DH, et al. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:1509–18.
- [6] Petit F, Arnoult D, Viollet L, Estaquier J. *Biochimie* 2003;85:795–811.
- [7] Sloan EM, Young NS, Kumar P, Weichold FF, Sato T, Maciejewski JP. *Blood* 1997;89:1357–63.
- [8] Heinkelein M, Muller M, Kutsch O, Sopper S, Jassoy C. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;16:74–82.
- [9] Gulow K, Kaminski M, Darvas K, Suss D, Li-Weber M, Krammer PH. *J Immunol* 2005;174:5249–60.
- [10] Yang Y, Tikhonov I, Ruckwardt TJ, Djavani M, Zapata JC, Pauza CD, et al. *J Virol* 2003;77:6700–8.
- [11] Yedavalli VS, Shih HM, Chiang YP, Lu CY, Chang LY, Chen MY, et al. *J Virol* 2005;79:13735–46.
- [12] Akari H, Bour S, Kao S, Adachi A, Strebel K. *J Exp Med* 2001;194:1299–311.
- [13] Laurent-Crawford AG, Krust B, Riviere Y, Desgranges C, Muller S, Kieny MP, et al. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9:761–73.
- [14] Ohnims H, Heinkelein M, Jassoy C. *J Immunol* 1997;159:5246–52.
- [15] Krambovitis E, Porichis F, Spandidos DA. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:1165–73.
- [16] Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, et al. *Science* 1997;278:1447–50.
- [17] Hazenberg MD, Hamann D, Schuitemaker H, Miedema F. *Nat Immunol* 2000;1:285–9.
- [18] Zafiroopoulos A, Baritaki S, Vlata Z, Spandidos DA, Krambovitis E. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284:875–9.
- [19] Zafiroopoulos A, Baritaki S, Sioumpara M, Spandidos DA, Krambovitis E. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:63–70.
- [20] Mahalingam S, Karupiah G. *Immunol Cell Biol* 1999;77:469–75.
- [21] Baritaki S, Zafiroopoulos A, Sioumpara M, Politis M, Spandidos DA, Krambovitis E. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:574–80.
- [22] Llewelyn M, Cohen J. *Lancet Infect Dis* 2002;2:156–62.
- [23] Proft T, Fraser JD. *Clin Exp Immunol* 2003;133:299–306.
- [24] Zafiroopoulos A, Andersson E, Krambovitis E, Borrebaeck CA. *J Immunol Methods* 1997;200:181–90.
- [25] Krambovitis E, Hatzidakis G, Barlos K. *J Biol Chem* 1998;273:10874–9.
- [26] Jaworowski A, Crowe SM. *Immunol Cell Biol* 1999;77:90–8.
- [27] Miura Y, Koyanagi Y. *Rev Med Virol* 2005;15:169–78.
- [28] Bell DJ, Dockrell DH. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2003;17:178–83.
- [29] Dellabona P, Peccoud J, Kappler J, Marrack P, Benoist C, Mathis D. *Cell* 1990;62:1115–21.
- [30] Seth A, Stern LJ, Ottenhoff TH, Engel I, Owen MJ, Lamb JR, et al. *Nature* 1994;369:324–7.
- [31] Labrecque N, Thibodeau J, Sekaly RP. *Semin Immunol* 1993;5:23–32.
- [32] Balaban N, Rasooly A. *Int J Food Microbiol* 2000;61:1–10.
- [33] Baker MD, Acharya KR. *Int J Med Microbiol* 2004;293:529–37.
- [34] Oppermann M. *Cell Signal* 2004;16:1201–10.
- [35] Galanakis PA, Spyroulias GA, Rizos A, Samolis P, Krambovitis E. *Curr Med Chem* 2005;12:1551–68.
- [36] Baritaki S, Dittmar MT, Spandidos DA, Krambovitis E. *Int J Mol Med* 2005;16:333–6.
- [37] Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:1925–30.
- [38] Maier R, Bartolome-Rodriguez MM, Moulon C, Weltzien HU, Meyerhans A. *Blood* 2000;96:1853–6.
- [39] Roy AM, Schweighardt B, Eckstein LA, Goldsmith MA, McCune JM. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005;40:267–75.
- [40] Gorak-Stolinska P, Kemeny DM, Noble A. *Cell Immunol* 2002;219:98–107.
- [41] Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JJ. *Nature* 1997;386:855–8.
- [42] Schreiber R. *J Membr Biol* 2005;205:129–37.
- [43] Mattson MP, Chan SL. *Nat Cell Biol* 2003;5:1041–3.
- [44] Lang F, Foller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, et al. *J Membr Biol* 2005;205:147–57.
- [45] Ludanyi K, Gogolak P, Rethi B, Magocsi M, Detre C, Matko J, et al. *Cell Signal* 2004;16:939–50.
- [46] Gougeon ML, Lecoeur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, et al. *J Immunol* 1996;156:3509–20.
- [47] Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. *J Exp Med* 1992;175:331–40.
- [48] Oyaizu N, McCloskey TW, Coronese M, Chirmule N, Kalyanaraman VS, Pahwa S. *Blood* 1993;82:3392–400.
- [49] Molon B, Gri G, Bettella M, Gomez-Mouton C, Lanzavecchia A, Martinez AC, et al. *Nat Immunol* 2005;6:465–71.
- [50] Krambovitis E, Zafiroopoulos A, Baritaki S, Spandidos DA. *Scand J Immunol* 2004;59:231–4.
- [51] Arthur LO, Bess Jr JW, Sowder 2nd RC, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, et al. *Science* 1992;258:1935–8.
- [52] Bounou S, Dumais N, Tremblay MJ. *J Biol Chem* 2001;276:6359–69.
- [53] Holm GH, Gabuzda D. *J Virol* 2005;79:6299–311.
- [54] Nabel G, Baltimore D. *Nature* 1987;326:711–3.
- [55] Lassen K, Han Y, Zhou Y, Siliciano J, Siliciano RF. *Trends Mol Med* 2004;10:525–31.
- [56] Greenway AL, McPhee DA, Allen K, Johnstone R, Holloway G, Mills J, et al. *J Virol* 2002;76:2692–702.
- [57] Greenway AL, Holloway G, McPhee DA, Ellis P, Cornall A, Lidman M. *J Biosci* 2003;28:323–35.
- [58] Fackler OT, Baur AS. *Immunity* 2002;16:493–7.
- [59] Dimitrov DS, Willey RL, Sato H, Chang LJ, Blumenthal R, Martin MA. *J Virol* 1993;67:2182–90.
- [60] Oxenius A, Fidler S, Brady M, Dawson SJ, Ruth K, Easterbrook PJ, et al. *Eur J Immunol* 2001;31:3782–8.
- [61] Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al. *Nature* 2002;417:95–8.

Invited review

HIV entry inhibitors: a new generation of antiretroviral drugs

Elias KRAMBOVITIS^{1,3}, Filippos PORICHIS^{1,2}, Demetrios A SPANDIDOS²

¹Department of Applied Biochemistry and Immunology, Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Vassilika Vouton, Heraklion, Crete, Greece; ²Greece Department of Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

Key words

highly active antiretroviral therapy; HIV receptors; HIV fusion inhibitors; HIV

³Correspondence to Prof Elias KRAMBOVITIS.
Phn 30-81-39-1020.
Fax 30-81-39-1101.
E-mail krambo@imbb.forth.gr

Received 2005-05-15
Accepted 2005-06-27

doi: 10.1111/j.1745-7254.2005.00193.x

Abstract

AIDS is presently treatable, and patients can have a good prognosis due to the success of highly active antiretroviral therapy (HAART), but it is still not curable or preventable. High toxicity of HAART, and the emergence of drug resistance add to the imperative to continue research into new strategies and interventions. Considerable progress in the understanding of HIV attachment and entry into host cells has suggested new possibilities for rationally designing agents that interfere with this process. The approval and introduction of the fusion inhibitor enfuvirtide (Fuzeon) for clinical use signals a new era in AIDS therapeutics. Here we review the crucial steps the virus uses to achieve cell entry, which merit attention as potential targets, and the compounds at pre-clinical and clinical development stages, reported to effectively inhibit cell entry.

Introduction

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) was recognized in 1981, and the first human immunodeficiency virus (HIV) was isolated 2 years later, heralding a new era in the fight against pathogenic viruses^[1,2]. Since then, HIV infection has become a major public health problem worldwide, with an estimated 39.4 million infected people as at the end of 2004 (Table 1)^[3]. According to the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) epidemic update, in 2004 there were more than 3.1 million AIDS deaths, including 500 000 children under 15 years of age^[4]. The prevalence of HIV-1 is greater in developing countries, and especially in Sub-Saharan Africa, where the infrastructure to prevent and treat the infection is limited^[5]. These “hotspots” absorb most of the attention of international committees and organizations, and a significant part of the funding for AIDS prevention and treatment goes towards attempting to scale up antiretroviral (ARV) therapy in developing and transitional countries^[6].

HIV is a lentivirus that is predominantly transmitted by sexual contact, as virus particles can cross the mucosal epithelium and infect specific cells^[7,8] expressing the CD4 receptor. Cells bearing CD4 receptors on their membrane belong to the macrophage/monocyte lineage and to a subset of T-cells^[9,10]. Initial indications were that HIV-1 used

only CD4 to identify and enter the target cells. Soon, however, it became apparent that additional co-receptors were probably required in order for the virus to complete cell entry. Subsequently, several such potential co-receptors were proposed^[11,12], but the CCR5 and CXCR4 chemokine receptors are today considered to be the major co-receptors for HIV-1 entry^[13–15]. T-cell tropic HIV strains use mainly CXCR4 as a co-receptor and are called X4 strains, whereas macrophage-

Table 1. Worldwide distribution of estimated number of people living with HIV^[4].

Region	Estimated number ¹⁾
North America	1.0 million (540 000–1.6 million)
Caribbean	440 000 (270 000–780 000)
Latin America	1.7 million (1.3–2.2 million)
Western and Central Europe	610 000 (480 000–760 000)
Eastern Europe and Central Asia	1.4 million (920 000–2.1 million)
North Africa and Middle East	540 000 (230 000–1.5 million)
Sub-Saharan Africa	25.4 million (23.4–28.4 million)
East Asia	1.1 million (560 000–1.8 million)
South and South-East Asia	7.1 million (4.4–10.6 million)
Oceania	35 000 (25 000–48 000)

¹⁾The ranges around the estimates define the boundaries within which the actual numbers lie based on the best available information^[4].

tropic strains, responsible for host-to-host transmission, use CCR5 as a co-receptor, and are referred to as R5 strains. Thus, macrophages are the principal targets for the establishment of the infection in new individuals^[16]. Although it is not always the case^[17,18], the transition from viral isolates that use the CCR5 receptor to isolates that use the CXCR4 receptor has been linked with the transition from the latent asymptomatic phase to the clinical manifestations associated with AIDS^[19,20].

The most striking feature of HIV-1 infection is the gradual depletion of circulating CD4⁺ T cells, which leads to increased sensitivity of the patient to opportunistic and chronic infections and to oncogenesis. The cause of the CD4⁺ T cell depletion is still under debate^[21–23]. It is generally accepted, however, that during the asymptomatic phase the daily replenishment rate of CD4⁺ T cells is much higher than the turnover of infective virus particles for the cytopathicity model to explain the progressive depletion of CD4⁺ T cells from circulation^[24]. An alternative hypothesis proposes that certain viral components contribute to dysfunction of a vital immune mechanism^[25].

Over the past 23 years, the main objective in the field of HIV research has been the discovery of drugs that will combat the disease. Satisfactory progress has already been made and there are now more than 20 anti-HIV drugs approved by the American Food and Drug Administration (FDA)^[26]. ARV drugs are categorized according to their mode of action into three main groups: 1) the nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI); 2) the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI)^[27,28]; and 3) the protease inhibitors (PI)^[29]. ARV drugs from these categories are now administered in combination (as cocktails) to produce more efficient treatment^[30]. This type of therapy, termed “highly active antiretroviral therapy” or HAART, has markedly decreased mortality and morbidity in the developed world. Efforts have been made by the World Health Organization (WHO) and UNAIDS

to substantially increase the number of people on HAART in developing and transitional countries^[6].

Despite the fact that current antiviral treatments have improved prognosis, drug resistance and high toxicity are serious limitations to current treatments that justify the continuation of research efforts for new strategies and interventions^[31,32]. Today, AIDS is treatable, and patients can have a good prognosis, but it is still not curable. A new generation of drugs was recently introduced that inhibit viral cell entry (to be discussed later). HIV entry inhibitors appear to be a rational step forward in ARV therapy, because they prevent the virus from infecting new host cells, and may potentially stop or significantly limit HIV transmission^[33–35]. In order to rationally design effective drugs, the pathophysiology of HIV must be better understood for ARV therapy research to target specific events in the biology of the virus within the host cell^[36,37].

HIV entry

HIV-1 predominately infects cells that have the CD4 receptor on their surface membrane, although this is not always the case^[38,39]. Achievement of infection of these cells involves three discrete steps: viral attachment, then co-receptor binding, and finally fusion (see Figure 1). Recognition of the “correct” target cell and attachment to it is primarily achieved through envelope glycoprotein gp120, which binds to CD4 molecules. Gp120 is generated within the infected host cell after cleavage of gp160 by cellular proteases into two functional proteins: gp120 and gp41. It consists of 5 variable (V1–V5) and 5 conserved (C1–C5) regions^[40]. Gp120 and gp41 are glycosylated in the Golgi apparatus, and then transported to the membrane that is later incorporated in the viral envelope during the budding of the viral particles to form mature viruses^[41]. The envelope membrane is studded with trimers of gp120-gp41 heterodimers, where gp41 forms

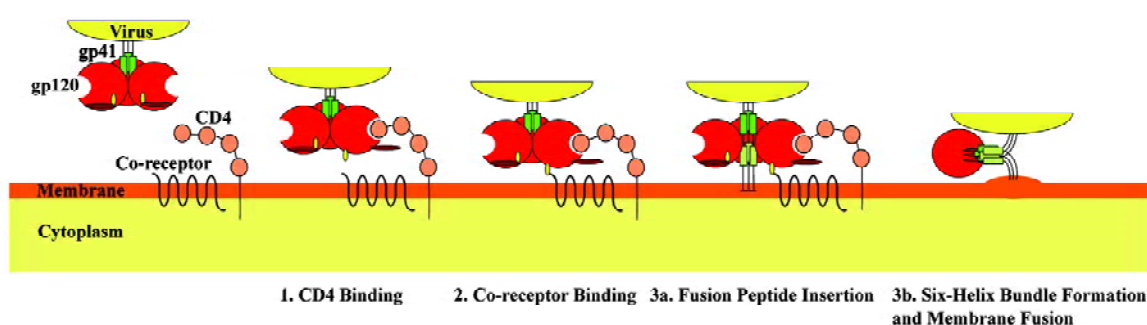


Figure 1. Schematic representation of the mechanism for HIV-1 cell entry.

the cytosolic part and gp120 the extracellular part^[42].

Binding of viral gp120 to host cell CD4 is achieved through interactions of several conserved gp120 residues with the second complementarity-determining region (CDR2) of CD4^[43,44]. This interaction alone is not sufficient to achieve cell entry, but it is necessary in order to identify the target cell and also to increase the affinity of other viral components for the co-receptor molecules. Indeed, binding of gp120 to CD4 causes conformational changes to the variable loop regions V1/V2 and V3 of gp120, causing the V3 loop to evaginate, thus becoming exposed to the co-receptors^[45] (Figure 1). The major co-receptors that HIV-1 uses are the CCR5 and CXCR4 chemokine receptors. The exact mechanism of interaction between the variable loop regions V1/V2 and V3 and the chemokine receptors is not well understood and it merits a more detailed investigation. It has been suggested, however, that the interaction between V3 and CCR5 is ionic in nature, and results in enhancement of the process of activation-induced cell death of responding effector CD4⁺ T cells during antigen presentation^[22,46,47].

The final step for viral entry requires fusion of the viral envelope components with the target surface membrane; this is achieved with the use of gp41, which is a glycoprotein consisting of 3 main domains: an intracellular domain (endodomain), a transmembrane anchor and an extracellular domain (ectodomain). The ectodomain is the key structure responsible for fusion and consists of a hydrophobic fusion peptide sequence at the N-terminal, two hydrophobic heptad repeats (HR1 and HR2) at the C-terminal, and a hinge region, where a disulfide-bond loop is formed between the two heptad repeats during fusion^[48,49]. On binding of gp120 to CD4 and subsequently to the co-receptor, further conformational changes occur that lead to gp41 dissociation from gp120. The gp41 unfolds and the hydrophobic fusion peptide sequence extends out of the viral membrane towards the host cell membrane. Insertion of the fusion peptide into the host cell membrane leads gp41 to fold into a hairpin-like structure where the two hydrophobic heptad repeats (HR1 and HR2) lie antiparallel, forming a 6-helix bundle^[50,51]. This hairpin structure is believed to be responsible for the fusion of the HIV envelope to the host cell membrane.

Enfuvirtide: the first FDA-approved fusion inhibitor

Enfuvirtide (formerly known as T-20) is the first fusion inhibitor approved by the FDA and the European Commission for the Treatment of AIDS, and is available under the trade name Fuzeon (Trimeris and Roche). It is a 36 amino

acid synthetic peptide homologous to the HR2 region of gp41 (residues 127-162)^[52,53], that has the ability to interfere with the fusion pathway by mimicking the HR2 domain^[54]. The accepted mode of action proposes that enfuvirtide targets conformational changes during fusion by binding to the HR1 domain. Recent evidence indicates that enfuvirtide interacts with multiple sites in gp41 and gp120^[55]. This binding prevents the formation of the 6-helix bundle by preventing HR2 from refolding antiparallel to HR1^[56,57]. Thus, inhibition of fusion of the viral envelope to cell membranes is achieved by blocking a critical step in the fusion pathway (Figure 2).

In the initial stages of discovery, enfuvirtide appeared to inhibit HIV-1 replication very effectively in various cell types and clinical trials proved to be very promising. Phase I/II trials provided proof that HIV entry was inhibited after treating patients with 100 mg enfuvirtide twice daily for 14 d. The levels of plasma HIV RNA after 14 d of treatment demonstrated a 1.96 lg median decline^[58]. Phase II clinical trials were performed on 71 HIV-infected individuals who were treated with 50 mg enfuvirtide together with other ARV drugs for 48 weeks. There was a 1.0 log₁₀ decline from baseline in HIV RNA and a median gain of CD4 cell counts of 84.9 cells/ μ L, with no significant toxicity^[59].

Furthermore, two TORO (T-20 vs Optimized Regimens Only) Phase III clinical trials were performed in America (TORO 1) and in Europe and Australia (TORO 2). The trials had similar protocols: they compared the efficacy and safety of enfuvirtide plus an optimized antiretroviral regimen with the efficacy and safety of an optimized antiretroviral regimen alone^[60,61]. In both studies the least-squares mean change from baseline in the plasma viral load indicated a significant difference in the decrease in the enfuvirtide group compared with the control ($P<0.01$). In the same way, the mean count of CD4 cells/mL was significantly greater in the enfuvirtide group compared with the controls ($P<0.01$).

Further studies are currently being performed on the exact metabolic pathway of enfuvirtide, potential drug resistance problems, and identification of synergistic interactions with other drugs. Several reports concluded that enfuvirtide does not appear to interfere with the activities of cytochrome P450, probably because it is a peptide and is easily hydrolyzed in the body^[62,63]. Enfuvirtide was found to act synergistically with other potential entry inhibitors *in vitro*, such as AMD3100 and PRO542, producing results that encouraged the use of combinations of entry inhibitors as part of a new generation of ARV strategies^[64,65]. However, HIV resistance has been reported in patients treated with enfuvirtide, indicating a hotspot from codons 36 to 38 of the HR1 domain^[66],

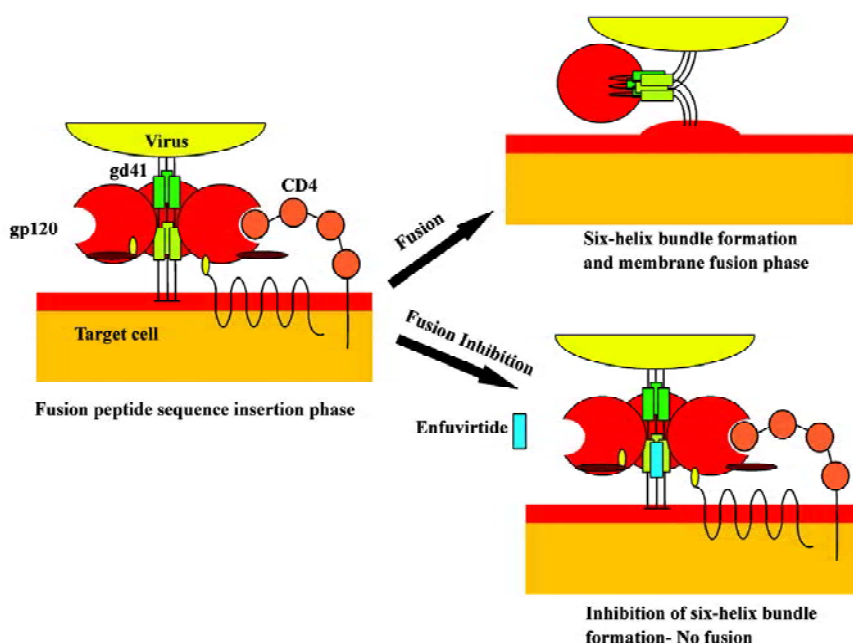


Figure 2. Mechanism of inhibition of HIV fusion to the cell membrane by enfuvirtide.

as well as other sites in gp41^[67–69]. Additionally, primary resistance has been reported, which appears to be more frequent than predicted^[70], indicating that more research is needed in this field.

Enfuvirtide obtained accelerated approval by the FDA in 2003 and became the 17th licensed ARV drug and the first to inhibit HIV entry. The drug is supplied as a lyophilized powder in single-dose vials containing 108 mg of the drug. Reconstitution of the powder in 1.1 mL sterile water for injection produces a single dose of 90 mg/mL^[71] that is injected subcutaneously. Enfuvirtide has two currently known major drawbacks. First, being a peptide, it can only be administered by injection and not orally. This makes usage more difficult, because patients must be educated for self-administration. Second, the cost of enfuvirtide is high, because it is a synthetic peptide that is manufactured by a highly complicated process involving large amounts of raw materials^[72,73]. It is estimated that the annual cost of enfuvirtide therapy is approximately US\$20 000 per patient, and if taken in combination with other ARV drugs then the cost of therapy could approach US\$30 000.

Potential drugs targeting entry and fusion

Attachment inhibitors Current novel antiretroviral drugs aim to interfere with the crucial HIV entry steps: viral attachment, co-receptor binding and fusion. One approach for interfering with viral attachment involves the use of a tetravalent fusion protein construct, consisting of a human

IgG2 in which the Fv portions of both the heavy and light chains have been replaced with the D1 and D2 domains of human CD4^[74,75]. This CD4-immunoglobulin fusion construct, called PRO 542, is suggested to bind to the viral gp120 and thus prevent the virus from interacting with CD4-bearing host cells. Phase I clinical trials indicated that PRO 542 has a half-life of 3–4 d when a relatively high dose was used (10 mg/kg), and no dose-limiting toxicities were observed^[76]. In addition, in phase II clinical trials, 12 HIV-infected patients were treated with 25 mg/kg single-dose PRO 542. The drug was well tolerated and the acute reduction caused in the HIV-1 RNA was statistically significant, even in patients with advanced AIDS^[77].

In the same way, several other compounds target either the gp120 or the CD4 receptor and interfere with HIV attachment. FP-21399 is a bis(disulfonaphthelene) derivative that binds to gp120, most probably near the third variable domain, because interactions with antibodies against the V3 loop region were blocked^[78]. A phase I study showed that it caused an increase in CD4 cell counts, and a significant decrease in viral load and minor side effects^[79]. BMS-378806, a 4-methoxy-7-azaindole derivative, is a compound that can be administered orally, and was developed by Bristol Myers Squibb^[80,81]. Despite the fact that phase I and II studies showed promising results, Bristol Myers Squibb decided to investigate similar drugs such as BMS-488043, an analogue of BMS-378806, in order to optimize its effectiveness^[82]. A series of polyanionic compounds, for example dextrin-2-sulfate, Carraguard and PRO 2000 are in clinical trials, and

are designed to be topically administered^[83–85]. Finally, TNX-355, a humanized anti-CD4 mAb that binds to CD4 without interfering with its biological function, significantly decreased viral load and increased CD4 cell counts in a phase I trial^[86].

Co-receptor binding inhibitors The most interesting target in HIV entry is the co-receptor binding phase. Current drug research is focused on designing compounds that prevent the virus interacting with the chemokine receptors. The CCR5 receptor is the principal target, and a number of potential drugs are currently being studied. SCH-C is a small molecule that inhibits the binding of gp120 to CCR5, and initial *in vitro* experiments have indicated good inhibitory activity against R5 viruses as well as synergistic effects with several ARV drugs, including enfuvirtide^[87,88]. Although it can be administered orally and clinical studies showed decreased viral loads, electrocardiographic anomalies due to arrhythmias were reported at high dosages^[89]. Another compound, SCH-D, has been found to have greater *in vitro* and *in vivo* antiviral properties, with no apparent side effects. Clinical studies for this drug are still ongoing^[90]. Interestingly, it was recently reported that V3-like peptides from X4 strains with more electropositive V3 domains were effective antagonists and potential infectivity blockers of R5 variants^[91].

TAK-779 was the first non-peptidic molecule found to inhibit co-receptor attachment by binding to CCR5 at transmembrane helices 1, 2, 3, and 7^[92,93]. It has the disadvantage of intravenous administration and because of irritations observed at the injection site, its development was discontinued. It was replaced by another compound, T-220, which can be administered orally, and shows promising anti-R5 HIV activity^[94]. Similarly, UK-427,857 is a novel CCR5 inhibitor that has acceptable pharmacokinetic and metabolic rates in mice, rats, dogs and humans, and can be administered orally^[95]. Finally, PRO 140 is one of the few monoclonal antibodies that has been used as an entry inhibitor and has been reported to block co-receptor attachment without down-modulating or inducing signaling of the CCR5 chemokine receptor^[96,97].

CXCR4, the second major HIV co-receptor, is also a target for current drug research. AMD-3100, one of the first entry inhibitors, was found to inhibit viral entry well before the discovery of co-receptor usage by HIV^[98]. It is a bicyclam compound of low molecular weight that inhibits the electrostatic interaction between CXCR4 and gp120 by ionic binding to the second extracellular loop (ECL2) and the adjacent membrane-spanning domain (TM4) of the CXCR4 receptor^[99]. Despite the fact that in phase I and II clinical trials, intravenous administration of AMD-3100 significantly reduced the

viral load^[100], it was later replaced by an orally available compound, AMD-070. A non-peptidic compound, KRH-1636, which is absorbed through the duodenum, had similar efficacies to AMD-3100^[101]. Finally, T-22 and ALX40-4C are positively charged peptides that occupy the V3 region and competitively inhibit binding of gp120 to the negatively charged amino acid residues on CXCR4^[102–104].

In conclusion, the role of the V3 region in the mechanism of cell attachment and entry in relation to the major co-receptors is being actively pursued. In addition to biological studies, physicochemical studies on the interacting protein domains are being carried out in an attempt to decipher the interface conformations between the virus and the cell^[105].

Fusion inhibitors Understanding the mechanism of fusion of the viral envelope with the host membrane played a crucial role in the development of new generation ARV drugs. This became apparent when enfuvirtide was licensed as the first viral entry inhibitor, and it is currently used in HAART. Resistance to enfuvirtide has been reported, which has led to the design of a second generation HR2 mimetic peptide. T-1249 is a 39-L-amino acid synthetic peptide that contains a pocket-binding sequence that makes the HR1 and HR2 interaction more stable. Studies on T-1249 showed that it has greater efficacy and longer half-life than enfuvirtide. Additionally, efficacy against enfuvirtide-resistant viruses has been reported, indicating that this second generation fusion inhibitor is a step forward^[106,107]. However, Roche and Trimeris decided to halt clinical development due to formulation concerns^[108].

5-Helix is a newly designed recombinant C-peptide that consists of 5 of the 6 helices that are formed during the fusion phase. A CHR domain is missing for the 6-helix bundle formation, and thus there is one exposed groove. This groove binds to a CHR domain in gp41 and inhibits fusion of the viral membrane to the host membrane^[109]. Because it is a recombinant peptide, it has a much lower cost of production compared with the synthetic enfuvirtide. Initial studies demonstrated potent antiretroviral activity, with IC₅₀ values in the low nanomolar range^[110].

Finally, N-peptides represent another group of peptides with potential inhibitory effects against HIV entry. Initial studies have indicated that they are weaker inhibitors than the C-peptides, with IC₅₀ values in the micromolar range. However, chimeric molecules composed of soluble trimeric coiled coils have shown promising results. IQN17 is one of the first such peptides with potent inhibitory effects, and the current most potent chimeric N-peptide, IQN23, is reported to have an IC₅₀ value of 15 nmol/L^[111].

Conclusion

Antiretroviral chemotherapy has recently acquired a new “weapon” in the fight against AIDS. Enfuvirtide is the first HIV entry inhibitor that was approved by FDA, and it is currently used in combination with other ARV drugs. Results from clinical trials indicated that it had potent activity against HIV strains that are resistant to other ARV drugs, although some resistance to enfuvirtide has been reported. The design of other entry inhibitors has moved forward, and every phase of HIV entry is actively pursued as a target for potential inhibitors. Probably the most exciting prospect is potential interference with co-receptor usage, particularly that of CCR5.

ARV drug development aims to produce drugs with potent antiretroviral activity, with IC_{50} values in the nanomolar range, with no or limited toxicity and that can be administered orally. Several compounds are currently in clinical trials, and we are optimistic that new, more effective drugs will be added to the ARV armory.

References

- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al*. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868–71.
- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, *et al*. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 865–7.
- HIV/AIDS Facts and figures [database on the internet]. New Delhi: WHO Regional Office for South-East Asia . [cited 2005 Apr 20]. Available from: <http://w3.who.sea.org/EN/Section10/Section18/Section348.htm#Global>
- UNAIDS/WHO. AIDS Epidemic Update. Geneva: UNAIDS; 2004.
- Gayle HD, Hill GL. Global impact of human immunodeficiency virus and AIDS. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 327–35.
- UNAIDS/WHO. ‘3 by 5’ Progress Report. France: WHO; 2005.
- Bomsel M. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 1997; 3: 42–7.
- Ullrich R, Schmidt W, Zippel T, Schneider T, Zeitz M, Riecken EO. Mucosal HIV infection. *Pathobiology* 1998; 66: 145–50.
- Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; 312: 763–7.
- Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Herceud T, *et al*. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; 312: 767–8.
- Rucker J, Samson M, Doranz BJ, Libert F, Berson JF, Yi Y, *et al*. Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell* 1996; 87: 437–46.
- Roderiquez G, Oravec T, Yanagishita M, Bou-Habib DC, Mostowski H, Norcross MA. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J Virol* 1995; 69: 2233–9.
- Berson JF, Long D, Doranz BJ, Rucker J, Jirik FR, Doms RW. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 1996; 70: 6288–95.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, *et al*. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381: 661–6.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, *et al*. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; 381: 667–73.
- van’t Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA, Albrecht-van Lent N, Scherpbier HJ, Veenstra J, *et al*. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J Clin Invest* 1994; 94: 2060–7.
- de Roda Husman AM, van Rij RP, Blaak H, Broersen S, Schuitemaker H. Adaptation to promiscuous usage of chemokine receptors is not a prerequisite for human immunodeficiency virus type 1 disease progression. *J Infect Dis* 1999; 180: 1106–15.
- Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, de Goede RE, van Steenwijk RP, *et al*. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992; 66: 1354–60.
- Bjorndal A, Sonnerborg A, Tscherning C, Albert J, Fenyo EM. Phenotypic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates of Ethiopian AIDS patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 647–53.
- Richman DD, Bozzette SA. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 1994; 169: 968–74.
- Roumier T, Castedo M, Perfettini JL, Andreau K, Metivier D, Zamzami N, *et al*. Mitochondrion-dependent caspase activation by the HIV-1 envelope. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1321–9.
- Zafiroopoulos A, Baritaki S, Sioumpara M, Spandidos DA, Krambovitis E. V3 induces in human normal cell populations an accelerated macrophage-mediated proliferation: apoptosis phenomenon of effector T cells when they respond to their cognate antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 63–70.
- Dockrell DH, Badley AD, Algeciras-Schimnich A, Simpson M, Schut R, Lynch DH, *et al*. Activation-induced CD4+ T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4+ T cell count, and HIV plasma viral copy number. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 1509–18.
- Graziosi C, Pantaleo G, Butini L, Demarest JF, Saag MS, Shaw GM, *et al*. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA and RNA synthesis during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6405–9.

- 25 Krambovitis E, Zafropoulos A, Baritaki S, Spandidos DA. Simple electrostatic interaction mechanisms in the service of HIV-1 pathogenesis. *Scand J Immunol* 2004; 59: 231–4.
- 26 De Clercq E. Antiviral drugs in current clinical use. *J Clin Virol* 2004; 30: 115–33.
- 27 Imamichi T. Action of anti-HIV drugs and resistance: reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 4039–53.
- 28 Zapor MJ, Cozza KL, Wynn GH, Wortmann GW, Armstrong SC. Antiretrovirals, Part II: focus on non-protease inhibitor antiretrovirals (NRTIs, NNRTIs, and fusion inhibitors). *Psychosomatics* 2004; 45: 524–35.
- 29 Dunn BM, Goodenow MM, Gustchina A, Wlodawer A. Retroviral proteases. *Genome Biol* 2002; 3: REVIEWS 3006.
- 30 Pereira CF, Paridaen JT. Anti-HIV drug development: an overview. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 4005–37.
- 31 Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, D'Aquila RT, Demeter LM, *et al*. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2004. *Top HIV Med* 2004; 12: 119–24.
- 32 van Heeswijk RP. Optimized antiretroviral therapy: the role of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2003; 1: 75–81.
- 33 Stone A. Microbicides: a new approach to preventing HIV and other sexually transmitted infections. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 977–85.
- 34 Moore JP, Shattock RJ. Preventing HIV-1 sexual transmission: not sexy enough science, or no benefit to the bottom line? *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 890–2.
- 35 Shattock RJ, Moore JP. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 2003; 1: 25–34.
- 36 Sleasman JW, Goodenow MM. 13. HIV-1 infection. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S582–92.
- 37 De Clercq E. HIV-chemotherapy and -prophylaxis: new drugs, leads and approaches. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1800–2.
- 38 Zerhouni B, Nelson JA, Saha K. CXCR4-dependent infection of CD8+, but not CD4+, lymphocytes by a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol* 2004; 78: 12288–96.
- 39 Zerhouni B, Nelson JA, Saha K. Isolation of CD4-independent primary human immunodeficiency virus type 1 isolates that are syncytium inducing and acutely cytopathic for CD8+ lymphocytes. *J Virol* 2004; 78: 1243–55.
- 40 Farzan M, Choe H, Desjardins E, Sun Y, Kuhn J, Cao J, *et al*. Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain. *J Virol* 1998; 72: 7620–5.
- 41 Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1990; 265: 10373–82.
- 42 Yang X, Farzan M, Wyatt R, Sodroski J. Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J Virol* 2000; 74: 5716–25.
- 43 Olshevsky U, Helseth E, Furman C, Li J, Haseltine W, Sodroski J. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J Virol* 1990; 64: 5701–7.
- 44 Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998; 393: 648–59.
- 45 Sullivan N, Sun Y, Sattentau Q, Thali M, Wu D, Denisova G, *et al*. CD4-Induced conformational changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. *J Virol* 1998; 72: 4694–703.
- 46 Zafropoulos A, Baritaki S, Vlata Z, Spandidos DA, Krambovitis E. Dys-regulation of effector CD4+ T cell function by the V3 domain of the HIV-1 gp120 during antigen presentation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284: 875–9.
- 47 Baritaki S, Zafropoulos A, Sioumpara M, Politis M, Spandidos DA, Krambovitis E. Ionic interaction of the HIV-1 V3 domain with CCR5 and deregulation of T lymphocyte function. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 574–80.
- 48 Bernstein HB, Tucker SP, Kar SR, McPherson SA, McPherson DT, Dubay JW, *et al*. Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41. *J Virol* 1995; 69: 2745–50.
- 49 Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J Gen Virol* 1990; 71: 3075–80.
- 50 Lu M, Blacklow SC, Kim PS. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* 1995; 2: 1075–82.
- 51 Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 1997; 387: 426–30.
- 52 Wild C, Oas T, McDanal C, Bolognesi D, Matthews T. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10537–41.
- 53 Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, McDanal CB, Matthews TJ. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9770–4.
- 54 Chen CH, Matthews TJ, McDanal CB, Bolognesi DP, Greenberg ML. A molecular clasp in the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 TM protein determines the anti-HIV activity of gp41 derivatives: implication for viral fusion. *J Virol* 1995; 69: 3771–7.
- 55 Liu S, Lu H, Niu J, Xu Y, Wu S, Jiang S. Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J Biol Chem* 2005; 280: 11259–73.
- 56 Lawless MK, Barney S, Guthrie KI, Bucy TB, Petteway SR Jr., Merutka G. HIV-1 membrane fusion mechanism: structural studies of the interactions between biologically-active peptides from gp41. *Biochemistry* 1996; 35: 13697–708.
- 57 Furuta RA, Wild CT, Weng Y, Weiss CD. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat Struct Biol* 1998; 5: 276–9.
- 58 Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA, Lee JY, *et al*. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry.

- Nat Med 1998; 4: 1302–7.
- 59 Lalezari JP, Eron JJ, Carlson M, Cohen C, DeJesus E, Arduino RC, *et al*. A phase II clinical study of the long-term safety and antiviral activity of enfuvirtide-based antiretroviral therapy. *Aids* 2003; 17: 691–8.
- 60 Lalezari JP, Henry K, O’Hearn M, Montaner JS, Piliero PJ, Trottier B, *et al*. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med* 2003; 348: 2175–85.
- 61 Lazzarin A, Clotet B, Cooper D, Reynes J, Arasteh K, Nelson M, *et al*. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* 2003; 348: 2186–95.
- 62 Zhang X, Lalezari JP, Badley AD, Dorr A, Kolis SJ, Kinchelov T, *et al*. Assessment of drug-drug interaction potential of enfuvirtide in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 558–68.
- 63 Ruxrungtham K, Boyd M, Bellibas SE, Zhang X, Dorr A, Kolis S, *et al*. Lack of interaction between enfuvirtide and ritonavir or ritonavir-boosted saquinavir in HIV-1-infected patients. *J Clin Pharmacol* 2004; 44: 793–803.
- 64 Tremblay CL, Kollmann C, Giguel F, Chou TC, Hirsch MS. Strong *in vitro* synergy between the fusion inhibitor T-20 and the CXCR4 blocker AMD-3100. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 25: 99–102.
- 65 Nagashima KA, Thompson DA, Rosenfield SI, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. Human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors PRO 542 and T-20 are potently synergistic in blocking virus-cell and cell-cell fusion. *J Infect Dis* 2001; 183: 1121–5.
- 66 Rimsky LT, Shugars DC, Matthews TJ. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol* 1998; 72: 986–93.
- 67 Wei X, Decker JM, Liu H, Zhang Z, Arani RB, Kilby JM, *et al*. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1896–905.
- 68 Poveda E, Rodes B, Toro C, Martin-Carbonero L, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. Evolution of the gp41 env region in HIV-infected patients receiving T-20, a fusion inhibitor. *Aids* 2002; 16: 1959–61.
- 69 Xu L, Pozniak A, Wildfire A, Stanfield-Oakley SA, Mosier SM, Ratcliffe D, *et al*. Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1113–9.
- 70 Carmona R, Perez-Alvarez L, Munoz M, Casado G, Delgado E, Sierra M, *et al*. Natural resistance-associated mutations to Enfuvirtide (T20) and polymorphisms in the gp41 region of different HIV-1 genetic forms from T20 naive patients. *J Clin Virol* 2005; 32: 248–53.
- 71 Fuzeon [package insert]. Injection Instructions. Durham, NC, and Nutley, NJ: Trimeris Inc and Roche Laboratories Inc; 2003.
- 72 Steinbrook R. HIV infection: a new drug and new costs. *N Engl J Med* 2003; 348: 2171–2.
- 73 Tashima KT, Carpenter CC. Fusion inhibition: a major but costly step forward in the treatment of HIV-1. *N Engl J Med* 2003; 348: 2249–50.
- 74 Allaway GP, Davis-Bruno KL, Beaudry GA, Garcia EB, Wong EL, Ryder AM, *et al*. Expression and characterization of CD4-IgG2, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 533–9.
- 75 Trkola A, Pomales AB, Yuan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, *et al*. Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol* 1995; 69: 6609–17.
- 76 Jacobson JM, Lowy I, Fletcher CV, O’Neill TJ, Tran DN, Ketas TJ, Trkola A, *et al*. Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults. *J Infect Dis* 2000; 182: 326–9.
- 77 Jacobson JM, Israel RJ, Lowy I, Ostrow NA, Vassiliatos LS, Barish M, *et al*. Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 423–9.
- 78 Ono M, Wada Y, Wu Y, Nemori R, Jinbo Y, Wang H, *et al*. FP-21399 blocks HIV envelope protein-mediated membrane fusion and concentrates in lymph nodes. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 343–8.
- 79 Dezube BJ, Dahl TA, Wong TK, Chapman B, Ono M, Yamaguchi N, *et al*. A fusion inhibitor (FP-21399) for the treatment of human immunodeficiency virus infection: a phase I study. *J Infect Dis* 2000; 182: 607–10.
- 80 Lin PF, Blair W, Wang T, Spicer T, Guo Q, Zhou N, *et al*. A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11013–8.
- 81 Si Z, Madani N, Cox JM, Chruma JJ, Klein JC, Schon A, *et al*. Small-molecule inhibitors of HIV-1 entry block receptor-induced conformational changes in the viral envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 5036–41.
- 82 Hanna G, Lalezari J, Hellinger J, Wohl D, Masterson T, Fiske W, *et al*. Antiviral activity, safety, and tolerability of a novel, oral small-molecule HIV-1 attachment inhibitor, BMS-488043, in HIV-1-infected subjects. In: Proceedings of the 11th conference on retroviruses and opportunistic infections; 2004 Feb 8–11, San Francisco. 2004.
- 83 Shaunak S, Thornton M, John S, Teo I, Peers E, Mason P, *et al*. Reduction of the viral load of HIV-1 after the intraperitoneal administration of dextrin 2-sulphate in patients with AIDS. *Aids* 1998; 12: 399–409.
- 84 Dezzutti CS, James VN, Ramos A, Sullivan ST, Siddig A, Bush TJ, *et al*. In vitro comparison of topical microbicides for prevention of human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3834–44.
- 85 Morrow K, Rosen R, Richter L, Emans A, Forbes A, Day J, *et al*. The acceptability of an investigational vaginal microbicide, PRO 2000 Gel, among women in a phase I clinical trial. *J Womens Health (Larchmt)* 2003; 12: 655–66.
- 86 Kuritzkes DR, Jacobson J, Powderly WG, Godofsky E, DeJesus E, Haas F, *et al*. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J Infect Dis* 2004; 189: 286–91.
- 87 Tremblay CL, Giguel F, Kollmann C, Guan Y, Chou TC, Baroudy BM, *et al*. Anti-human immunodeficiency virus interactions of SCH-C (SCH 351125), a CCR5 antagonist, with other antiret-

- roviral agents *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1336–9.
- 88 Tsamis F, Gavrilov S, Kajumo F, Seibert C, Kuhmann S, Ketas T, *et al*. Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* 2003; 77: 5201–8.
- 89 Reynes J, Rouzier R, Kanouni T, Baillat V, Baroudy B, Keung A. SCH C: Safety and antiviral effects of a CCR5 receptor antagonist in HIV-1-infected subjects. In: Proceedings of the 9th conference on retroviruses and opportunistic infections; 2002 Feb 24–28, San Francisco. 2002
- 90 Schurmann D, Rouzier R, Nougarede R, Reynes J, Fatkenheuer G, Raffi F, *et al*. SCH D: Antiviral activity of a CCR5 receptor antagonist. In: Proceedings of the 11th conference on retroviruses and opportunistic infections, 2004 Feb 8–11, San Francisco. 2004.
- 91 Baritaki S, Dittmar MT, Spandidos DA, Krambovitis E. *In vitro* inhibition of R5 HIV-1 infectivity by X4 V3-derived synthetic peptides. *Int J Mol Med* 2005; 16: 333–6.
- 92 Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, *et al*. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5698–703.
- 93 Dragic T, Trkola A, Thompson DA, Cormier EG, Kajumo FA, Maxwell E, *et al*. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5639–44.
- 94 Iizawa Y, Kanzaki N, Takashima K, Miyake H, Tagawa Y, Sugihara Y, *et al*. Anti-HIV-1 Activity of TAK-220, a Small Molecule CCR5 Antagonist. In: Proceedings of the 10th conference on retroviruses and opportunistic infections, 2003 Feb 10–14, San Francisco. 2003.
- 95 Walker DK, Abel S, Comby P, Muirhead GJ, Nedderman AN, Smith DA. Species differences in the disposition of the CCR5 antagonist, UK-427,857, a new potential treatment for HIV. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 587–95.
- 96 Olson WC, Rabut GE, Nagashima KA, Tran DN, Anselma DJ, Monard SP, *et al*. Differential inhibition of human immunodeficiency virus type 1 fusion, gp120 binding, and CC-chemokine activity by monoclonal antibodies to CCR5. *J Virol* 1999; 73: 4145–55.
- 97 Trkola A, Ketas TJ, Nagashima KA, Zhao L, Cilliers T, Morris L, *et al*. Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J Virol* 2001; 75: 579–88.
- 98 de Clercq E, Yamamoto N, Pauwels R, Balzarini J, Witvrouw M, De Vreese K, *et al*. Highly potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus by the bicyclam derivative JM3100. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 668–74.
- 99 Labrosse B, Brelot A, Heveker N, Sol N, Schols D, De Clercq E, *et al*. Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *J Virol* 1998; 72: 6381–8.
- 100 Hendrix CW, Flexner C, MacFarland RT, Giandomenico C, Fuchs EJ, Redpath E, *et al*. Pharmacokinetics and safety of AMD-3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1667–73.
- 101 Ichiyama K, Yokoyama-Kumakura S, Tanaka Y, Tanaka R, Hirose K, *et al*. A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4185–90.
- 102 Doranz BJ, Grovit-Ferbas K, Sharron MP, Mao SH, Goetz MB, Daar ES, *et al*. A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J Exp Med* 1997; 186: 1395–400.
- 103 Murakami T, Nakajima T, Koyanagi Y, Tachibana K, Fujii N, Tamamura H, *et al*. A small molecule CXCR4 inhibitor that blocks T cell line-tropic HIV-1 infection. *J Exp Med* 1997; 186: 1389–93.
- 104 Murakami T, Zhang TY, Koyanagi Y, Tanaka Y, Kim J, Suzuki Y, *et al*. Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73: 7489–96.
- 105 Galanakis PA, Spyroulias GA, Rizos A, Samolis P, Krambovitis E. Conformational properties of HIV-1 gp120/V3 immunogenic domains. *Curr Med Chem* 2005; 12: 551–68.
- 106 Eron JJ, Gulick RM, Bartlett JA, Merigan T, Arduino R, Kilby JM, *et al*. Short-term safety and antiretroviral activity of T-1249, a second-generation fusion inhibitor of HIV. *J Infect Dis* 2004; 189: 1075–83.
- 107 Lalezari JP, Bellos NC, Sathasivam K, Richmond GJ, Cohen CJ, Myers RA, *et al*. T-1249 retains potent antiretroviral activity in patients who had experienced virological failure while on an enfuvirtide-containing treatment regimen. *J Infect Dis* 2005; 191: 1155–63.
- 108 Martin-Carbonero L. Discontinuation of the clinical development of fusion inhibitor T-1249. *AIDS Rev* 2004; 6: 61–3.
- 109 Root MJ, Kay MS, Kim PS. Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science* 2001; 291: 884–8.
- 110 Root MJ, Hamer DH. Targeting therapeutics to an exposed and conserved binding element of the HIV-1 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5016–21.
- 111 Eckert DM, Kim PS. Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 11187–92.

Η φωτογραφία στο εξώφυλλο είναι από
http://twistedphysics.typepad.com/cocktail_party_physics/2007/03/lateral_moves.html