

Indice

Abbreviazioni	5
Sommario	9
Abstract	11
1. Introduzione	13
1.1 <i>Orthomyxoviridae</i> : caratteristiche generali	13
1.1.a Virus dell'influenza A	14
1.1.b Virus dell'influenza B	14
1.1.c Virus dell'influenza C	14
1.1.d Nomenclatura	14
1.2 Virus dell'influenza A	15
1.2.a Struttura del virione	15
1.2.b Organizzazione del genoma	16
1.2.c Ciclo replicativo	20
1.3 Il complesso della RNA polimerasi virale	25
1.4 Evoluzione del virus dell'influenza	30
1.5 Determinanti di patogenicità del virus dell'influenza	31
1.6 Epidemiologia e patogenesi delle infezioni da virus dell'influenza	31
1.7 Prevenzione, profilassi e terapia	32
1.8 Inibitori dell'interazione tra le subunità di DNA polimerasi	35
2. Scopo	39
3. Materiali e Metodi	41
3.1 Composti	41
3.2 Proteine	41
3.3 Oligonucleotidi sintetici	41
3.4 Plasmidi	42
3.4.a Plasmide pcDNA3	42
3.4.b Plasmide pRSET	43
3.4.c Plasmide pD15-GST	43
3.4.d Plasmide pET28a	43
3.4.e Plasmidi per il saggio di minireplicon con il virus dell'influenza B	44
3.5 Cellule e Virus	44
3.6 Ceppo batterico e terreni di coltura	45
3.7 Trasformazione batterica mediante elettroporazione	45
3.7.a Preparazione di batteri elettrocompetenti	45
3.7.b Trasformazione mediante elettroporazione	45
3.8 Tecniche di biologia molecolare	46
3.8.a Estrazione e purificazione di DNA plasmidico da <i>E. coli</i>	46
3.8.b Taglio di DNA con enzimi di restrizione	46
3.8.c PCR ("polymerase chain reaction", reazione a catena della polimerasi)	46
3.8.d Separazione dei frammenti di DNA con gel d'agarosio	47
3.8.e Purificazione di DNA plasmidico da gel	47
3.8.f Ligazione di frammenti di DNA	47
3.8.g Sequenziamento	47
3.8.h Mutagenesi sito-diretta	48

3.9	Espressione e purificazione di proteine di fusione.....	48
3.9.a	Espressione e purificazione della proteina di fusione 6His-PA (239-716)	48
3.9.b	Espressione e purificazione della proteina di fusione GST-PB1(1-25)	49
3.9.c	Analisi elettroforetica di proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE)	50
3.9.d	Determinazione della concentrazione proteica secondo il metodo di Bradford (BioRad protein assay)	50
3.10	ELISA.....	50
3.11	Saggio di BiFC (<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>).....	51
3.12	Trascrizione e traduzione <i>in vitro</i> della proteina PB1	51
3.13	Saggio di <i>His-pulldown</i>	52
3.14	Analisi elettroforetica di proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE)	52
3.15	<i>Minireplicon assay</i> Influenza A	53
3.16	<i>Minireplicon assay</i> Influenza B	53
3.17	Preparazione degli <i>stocks</i> virali.....	54
3.18	Titolazione degli <i>stocks</i> virali dei ceppi di influenza.....	54
3.19	Saggi di citotossicità.....	54
3.20	Saggi di attività antivirale	55
3.20.a	Saggi di riduzione delle placche con Flu, HSV-1 e VSV.....	55
3.20.b	Analisi dell'espressione proteica virale con esperimenti di pulse-chase	56
3.20.c	Effetto dei composti sulla replicazione virale a diversi tempi e concentrazioni post-infezione.....	56
3.20.d	Effetto dei composti durante un singolo ciclo di replicazione virale.....	57
3.20.e	Saggio di inibizione della traslocazione del complesso PA/PB1	57
4.	Risultati e discussione	58
4.1	<i>Screening in silico</i>	58
4.2	Creazione delle proteine di fusione GST-PB1 (1-25) e pET28a-PA (239-716)	59
4.3	Purificazione della proteina di fusione 6His-PA (239-716).....	60
4.4	Purificazione della proteina di fusione GST-PB1 (1-25).....	61
4.5	ELISA con le proteine purificate 6His-PA (239-716) e GST-PB1 (1-25).....	62
4.6	Studio dell'effetto dei composti sull'interazione PA/PB1 in un contesto cellulare.....	66
4.6.a	Creazione dei plasmidi pcDNA-PA-EGFP (158-239), pcDNA-PB1-EGFP (1-157) e pcDNA-PB2-EGFP (158-239).	67
4.6.b	Messa a punto del saggio di BiFC (<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>).....	68
4.7	Saggio <i>His-pulldown</i> con IVT PB1 e 6His-PA (239-716) purificata.....	69
4.8	Saggi di citotossicità in cellule HEK 293T e MDCK	70
4.9	Identificazione di composti analoghi	71
4.10	ELISA con i composti analoghi dei composti attivi	72
4.11	Saggi di citotossicità in cellule HEK 293T e MDCK con i composti analoghi.....	73
4.12	Saggi di citotossicità in cellule A549 e HSB-2.....	74
4.13	<i>Minireplicon assay</i> con plasmidi esprimenti proteine del virus dell'influenza A.....	75
4.14	<i>Minireplicon assay</i> con plasmidi esprimenti proteine del virus dell'influenza B.....	78
4.15	Produzione di <i>stocks</i> virali di A/PR/8/34, A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06, A/PARMA/24/09 e B/Malaysia/2506/4 e determinazione del loro titolo.....	78
4.16	Attività antivirale dei composti	79
4.16.a	Effetto antivirale dei composti contro A/PR/8/34.....	79

4.16.b Effetto antivirale dei composti contro il virus dell'influenza B B/Malaysia/2506/4	81
4.16.c Effetto antivirale dei composti contro i ceppi clinici A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06 e A/PARMA/24/09	82
4.17 Effetto antivirale dei composti contro altri virus: VSV e HSV-1	84
4.18 Caratterizzazione dell'effetto dei composti sull'espressione delle proteine virali	86
4.19 Studio dell'effetto dei composti sulla replicazione virale a diversi tempi post-infezione	87
4.20 Studio della variazione dell'EC ₅₀ dei composti a diversi tempi post-infezione	88
4.21 Effetto dei composti su un singolo ciclo di replicazione virale.....	90
4.22 Studio dell'effetto dei composti sulla traslocazione nucleare del complesso PA/PB1	91
4.23 Caratterizzazione dell'attività antivirale contro il virus dell'influenza di Stealth siRNA diretti contro la polimerasi virale	92
4.23.a Studio della citotossicità degli Stealth siRNA in cellule HEK 293T	93
4.23.b Caratterizzazione dell'attività inibitoria degli Stealth siRNA contro la polimerasi del virus dell'influenza	93
5. Conclusioni	95
6. Bibliografia	97

Abbreviazioni

aa: amminoacido (i)

A: adenina (base)

ADME: Assorbimento Distribuzione Metabolismo ed Escrezione

BSA: albumina di siero bovino

bp: *base pair*, paio di basi

CC₅₀: *Citotoxicity Concentration 50%*, concentrazione di composto che causa citotossicità sul 50% delle cellule

CRM1: Regione Cromosomica di Mantenimento 1

DMSO: dimetilsolfossido

DNA: *Deoxyribonucleic acid*, acido deossiribonucleico

dNTP(s): *deoxyriboNucleotide(s) TriPhosphate*, deossiribonucleotidi trifosfati

ddNTPs: *dideoxyriboNucleotide(s) TriPhosphate*, di-deossiribonucleotidi trifosfati (terminatori)

ds/ss RNA: *double/single stranded RNA*, RNA a doppio/singolo filamento

DTT: ditionitrotolo

EC₅₀: *Effective Concentration 50%*, concentrazione richiesta per ridurre del 50% la replicazione virale

EDTA: Acido etilen-diammino tetraacetico (disodico)

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

eGFP: *enhanced Green Fluorescence Protein*

FBS: *Fetal Bovine Serum*, siero fetale bovino

Flu: Influenza

G: guanosina (base)

GCV: Ganciclovir

GST: Glutathione-S-Transferasi

HA: emoagglutinina

HCMV: Citomegalovirus umano

HPAI: *Highly Pathogenic Avian Influenza*, Virus dell'Influenza Aviaria Altamente Patogeno

HSV: Herpes simplex virus

IC₅₀: *Inibitory Concentration 50%*, concentrazione inibitoria del 50%

IPTG: Isopropil β-D-1-tiogalattopiranoside

kbp: kilobasi

kDa: kiloDalton

LB: Luria-Bertani

LPAI: *Low Pathogenic Avian Influenza*, Virus dell'Influenza Aviaria Poco Patogeno
MOI: *Multiplicity Of Infection*, molteplicità di infezione
MP: mono-fosfato
mRNA: RNA messaggero
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide
M: proteina di matrice
NA: neuraminidasi
NLS: segnale di localizzazione nucleare
NP: nucleoproteina
OD: *Optical Density*, densità ottica
O/N: *Overnight*
ORF: *Open Reading Frame*, putativa sequenza genica
NANA: Acido N-acetilneuramico
NEP: proteina di esportazione nucleare
NS: proteina non strutturale
PA: *acid protein*, proteina acida
PB: *basic protein*, proteina basica
PBS: *Phosphate Buffer Saline*, tampone fosfato salino
PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reazione a catena della DNA polimerasi
PEG: poli-etilen glicole
PFU: *Plaque Forming Unit(s)*, unità formanti placca
PRA: *Plaque Reduction Assay*, saggio di riduzione delle placche
P/S: Penicillina/Streptomina
RBV: Ribavirina
RE: Reticolo Endoplasmatico
RNA: *Ribonucleic acid*, acido ribonucleico
RNP: particelle ribonucleoproteiche
rpm: *rounds per minute*, giri al minuto
RR: ribonucleotide reduttasi
RSV: virus respiratorio sinciziale
SAR: *Structure-Activity Relationship*
SDS: sodio dodecil solfato
SI: *Selectivity Index*, indice di selettività
siRNA: *small interference RNA*
SNC: Sistema Nervoso Centrale
T: timidina (base); oppure Temperatura
TAE: Tris-acetato-EDTA
TBHQ : tert-butil idrochinone

TE: Tris-EDTA

Tris: Tris (idrossimetil) amminometano

TP: tri-fosfato

U: Unità

U_L: *Unique long*, (regione) unica lunga

UV: ultravioletto

vRNA: *viral Ribonucleic acid*, acido ribonucleico virale

VSV: vesicular stomatitis virus

wt: *wild-type*, selvatico

Sommario

L'influenza è un'infezione respiratoria, di origine virale, caratterizzata da elevata morbilità e mortalità soprattutto nella popolazione ad alto rischio (bambini, anziani, pazienti con malattie croniche/debilitanti, ecc.). Ogni anno il 20% della popolazione è affetto da un'epidemia causata dalla variabilità antigenica dei diversi ceppi di influenza, questo comporta che il vaccino anti-influenza debba essere riformulato di anno in anno con un considerevole impatto economico. Inoltre il virus dell'influenza è responsabile di pandemie occasionali che colpiscono milioni di persone in tutto il mondo e che si verificano ogni 10-30 anni con incidenza di morte dell'ordine del milione. Gli uccelli selvatici (uccelli acquatici, anatre selvatiche, etc.) sono il serbatoio naturale del virus aviario, e i recenti casi di influenza aviaria che hanno colpito l'uomo indicano che una nuova epidemia influenzale potrebbe essere in grado non solo di saltare le barriere tra le specie ma anche di trasmettersi da uomo a uomo causando milioni di morti. Per questi motivi esiste la necessità di trovare un nuovo farmaco che abbia come bersaglio un elemento virale conservato.

Attualmente esistono in commercio pochi farmaci anti-influenza, che hanno come bersaglio alcune proteine virali di superficie: neuraminidasi (NA) e una proteina che costituisce un canale ionico (M2). Oseltamivir (Tamiflu) e zanamivir sono inibitori di NA e prevengono il rilascio delle particelle virali dalle cellule infettate (per flu A e flu B). Amantadina e rimantadina invece hanno come bersaglio la proteina M2, e agiscono sulla scapsidazione del virus. Questi farmaci presentano però numerosi svantaggi: possono avere effetti collaterali causando tossicità a livello neurologico, non possono essere somministrati al di sotto dei 12 anni di età, infine per essere efficaci devono essere assunti entro le 48 ore dall'insorgenza dei sintomi; inoltre, per tali farmaci si è registrata la comparsa di molti ceppi virali resistenti. Il vaccino anti-influenza che viene messo a disposizione per la popolazione ha lo svantaggio di dover essere riformulato ogni anno a causa dell'elevata variabilità antigenica dei diversi ceppi. Di fatto, non esiste una terapia efficace e persiste quindi una necessità reale di sviluppare nuovi farmaci anti-influenza soprattutto dotati di un meccanismo d'azione diverso da quello dei farmaci attualmente a disposizione. Un possibile bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci antivirali è l'RNA polimerasi codificata dal virus dell'influenza, in quanto è un elemento conservato fra i diversi ceppi virali e non è soggetto a riassortimento genico. Le tre subunità proteiche che costituiscono la RNA polimerasi virale (un eterotrimerico costituito da PB1, PB2 e PA in rapporto stechiometrico 1:1:1) interagiscono fisicamente tra loro e, in particolare, la subunità PB1 interagisce sia con PB2 che con PA, ma non c'è interazione tra PB2 e PA. È stato dimostrato che l'interazione PA/PB1 è essenziale per la replicazione del virus dell'influenza: infatti l'inibizione di questa interazione causa anche inibizione della replicazione virale. L'utilizzo della polimerasi come *target* farmacologico permetterebbe quindi di inibire la replicazione virale ovviando al problema della variabilità antigenica e si otterrebbe un farmaco attivo contro moltissimi, se non tutti, i ceppi del virus dell'influenza. Il fatto che il sito di legame PA-PB1 sia molto conservato e che l'interazione sia cruciale per molte funzioni virali fa sì che esso rappresenti un potenziale bersaglio per lo sviluppo di nuovi composti antivirali.

Scopo di questo progetto è stato quello di identificare *small molecules* in grado di dissociare l'interazione fisica tra le subunità PB1 e PA della RNA polimerasi del virus dell'influenza e quindi la replicazione virale. È stato condotto uno *screening in silico* di molecole, a partire da circa 3 milioni di composti virtuali, utilizzando la struttura

cristallografica del complesso PA/PB1 e ne sono state identificate 32 potenzialmente capaci di inibire questa interazione. Questi 32 composti sono stati inizialmente saggiati mediante ELISA, per verificare la loro effettiva capacità di dissociare *in vitro* l'interazione PA/PB1. Da questa prima analisi sono stati identificati 3 composti in grado di dissociare l'interazione con un valore di IC₅₀ comparabile al peptide corrispondente ai 15 aa di PB1, che rappresenta la regione di interazione con PA e che è stato dimostrato essere sufficiente per inibire l'interazione PA/PB1. Successivamente è stata valutata la citotossicità delle molecole e sono stati disegnati dei composti analoghi a quelli maggiormente attivi per cercare di aumentarne l'attività antivirale e/o diminuirne la citotossicità. L'attività dei composti è stata confermata mediante *minireplicon assay*, un saggio cellulare che permette di determinare l'effetto delle molecole sull'attività polimerasica sia del virus dell'influenza A che B. Sono stati identificati alcuni composti in grado di inibire l'attività polimerasica virale con un valore di IC₅₀ comparabile a quello del peptide di controllo. È stata valutata, a questo punto, la capacità dei composti di inibire la replicazione virale mediante saggio di riduzione delle placche. Quello che è emerso è che 3 composti inibiscono la replicazione del virus A/PR/8/34 con valori di EC₅₀ comparabili a quelli della ribavirina (RBV), utilizzata come controllo, e a quelli dei farmaci attualmente utilizzati in terapia. Inoltre, è stata valutata la capacità di questi composti di inibire anche la replicazione di un virus dell'influenza B (B/Malaysia/2506/4) e altri ceppi di influenza A (A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06 e A/PARMA/24/09 Tamiflu-resistente). È stato osservato che i composti 1 e 34 sono attivi contro questi ceppi di influenza in maniera analoga al composto di riferimento RBV (EC₅₀ 18-22,5 μM composto 1; EC₅₀ 17-25 μM composto 34; EC₅₀ 7-18 μM RBV). Per il composto 34 è stata anche valutata l'attività antivirale nel tempo; quello che è emerso è che una elevata attività è mantenuta fino a 12 h post-infezione (1-2 μM). L'attività antivirale dei composti 1 e 34 è stata valutata anche caratterizzando il loro effetto sull'espressione delle proteine virali. Entrambi i composti hanno mostrato attività antivirale. Inoltre è stata determinata l'attività del composto 34 sulla traslocazione intranucleare del complesso PB1/PA; il composto 34 ha mostrato attività antivirale anche in questo saggio. Studi per caratterizzarne ulteriormente l'attività e per identificarne dei nuovi analoghi possibilmente più attivi sono in corso.

In parallelo sono stati saggiati alcuni Stealth siRNA disegnati contro il trascritto di *PB1* per valutare la loro capacità di inibire l'attività polimerasica. Dati precedenti hanno dimostrato attività antivirale per uno di questi siRNA in cellule infettate; la capacità di inibire anche l'attività polimerasica è stata confermata mediante *minireplicon assay* (inibizione dell'80% a concentrazione 30 nM).

Possiamo quindi concludere di aver identificato due composti, composto 1 e 34, e un siRNA che possono essere considerati dei buoni candidati per lo sviluppo di un farmaco anti-influenza. Ci proponiamo di caratterizzare ulteriormente l'attività antivirale dei composti identificati, e, per quanto riguarda i composti selezionati mediante lo *screening in silico*, di identificare dei composti analoghi in modo da aumentare la loro attività antivirale.

Abstract

Influenza (flu) is an airborne highly-infectious disease, characterized by high morbidity and significant mortality, especially in at-risk population (young children, elderly people, patients with chronic disease). Annually, 20% of general population is affected by seasonal epidemics sustained by genetic variants of already circulating influenza virus strains. For this reason the vaccine has to be changed every year with a considerable economic impact. Furthermore, the influenza virus is responsible for occasional pandemics affecting millions of people worldwide. The migratory water bird are the natural reservoir for the avian flu. The recent avian flu virus that affected humans suggests that a new flu epidemic could be able to overcome the species barrier and spread from human to human. For these reasons there is an urgent need to develop a new drug able to target a conserved flu motif.

To date, there are a few commercially available drugs that target some envelope viral proteins: neuraminidase (NA) and the M2 ion channel. Oseltamivir (Tamiflu) and zanamivir are NA inhibitors, which prevent the release of the viral particle from infected cells and are active against flu A and flu B. Amantadine and rimantadine inhibit the protein M2 and viral uncoating. These drugs have important drawbacks including neurological toxicity, they can't be administered to subjects younger than 12 year-old, finally, they have to be taken at the time of onset of symptoms. Furthermore, they can very frequently cause the induction of drug-resistant strains.

Moreover, although an anti-flu vaccine is available, it has to be changed every year because the virus is prone to antigenic modifications. For all of the above, there is still an urgent need for effective anti-flu compounds with a different mechanism of action from the current anti-flu drugs.

A possible novel anti-influenza strategy is represented by the RNA polymerase encoded by flu virus; in fact, the influenza virus polymerase is a conserved element among different viral strains, as it is not subjected to genetic variability.

The influenza virus RNA polymerase is a heterocomplex which consists of three proteins (PB1, PB2, and PA) that interact each other, in particular PB1 interacts with PB2 and PA, while PA and PB2 do not interact. It has been demonstrated that the PA/PB1 interaction is crucial for flu virus replication: in fact, the inhibition of this interaction causes the inhibition of flu replication. Thus, the inhibition of such interactions may represent a feasible strategy for the development of anti-flu compounds able to block the replication of the virus independently from the viral strain.

The main aim of this project is to identify small molecules able to block the interaction between the PA and PB1 subunits of the viral RNA polymerase and consequently to inhibit virus replication. To this aim, an *in silico* screening has been conducted on approximately 3 millions of virtual compounds taking advantage of the crystallographic structure of a truncated form of PA bound a PB1-derived peptide. In this screening we identified 32 compounds potentially able to inhibit the PA/PB1 interaction. We then tested these compounds using an ELISA to verify their capability to disrupt the physical interaction between PA and PB1 *in vitro*. From this analysis, we identified 3 compounds able to block the PA/PB1 interaction with an IC_{50} comparable to that of a peptide corresponding to aa 1-15 of PB1, that represent the PA-binding domain. In addition, the cytotoxicity of the active compounds has been evaluated in a panel of cell lines. Analogs of the most promising compounds have been synthesized to increase antiviral activity and decrease the toxicity. The compound activity has been further characterized by the "minireplicon assay", a

cellular assay that evaluates the compounds effects on flu A and flu B polymerase activity. We identified some compounds able to inhibit the polymerase activity with an IC_{50} value comparable to that of the PB1₁₋₁₅ peptide.

We also analysed the ability of the compounds to inhibit the viral replication by a plaque reduction assay. We found that 3 compounds inhibit flu A/PR/8/34 replication with EC_{50} values comparable to that of the reference compound ribavirin (RBV).

Furthermore, we evaluated the activity of these compounds on the replication of a flu B strain (B/Malaysia/2506/4) and of some flu A strains (A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06, and Tamiflu-resistant A/PARMA/24/09).

Compounds 1 and 34 showed an antiviral activity against these flu strains comparable with that of RBV (EC_{50} 18-22,5 μ M for compound 1; EC_{50} 17-25 μ M for compound 34; EC_{50} 7-18 μ M for RBV).

The antiviral activity of the compound 34 has been also characterised at different time post-infection. We found that this molecule has higher antiviral activity until 12 hours post-infection (1-2 μ M). Finally, its activity was evaluated also on the intranuclear traslocation of the PA/PB1 complex and on viral protein expression. Compound 34 showed antiviral activity also in these assays. Studies to characterise further its activity and to identify more potent analogues are in progress.

Finally, another line of research characterized at the same time, some Stealth siRNAs directed against PB1 mRNA and evaluated their capability to inhibit the flu polymerase activity. Previously data reported an antiviral activity for one of these siRNAs in infected cells; we have confirmed its antiviral activity by minireplicon assays (80% of inhibition at 30 nM).

We can conclude that we identified two compounds, compound 1 and 34, and a siRNA that are a good candidate for development of a new anti-flu compound. In the future, we are going to characterize the antiviral activity of the selected compounds and identify new analogues compounds to increase their antiviral activity.

1. Introduzione

1.1 *Orthomyxoviridae*: caratteristiche generali

La famiglia *Orthomyxoviridae* comprende cinque virus patogeni sia per l'uomo che per molti animali. Il termine *Orthomyxoviridae* deriva dal greco *orthos* che significa dritto e *myxa* che significa muco. Gli orthomyxovirus sono virus dotati di *envelope* e di un genoma segmentato ad RNA a singolo filamento (ssRNA) a polarità negativa (Palese, 2007).

Appartengono alla famiglia *Orthomyxoviridae* i seguenti virus:

- Virus dell'influenza A
- Virus dell'influenza B
- Virus dell'influenza C
- Thogotovirus
- Isavirus

I primi tre generi rappresentano i virus che provocano l'influenza nei vertebrati (uomo ed altri mammiferi). Gli isovirus infettano i salmoni e i thogotovirus infettano i vertebrati ed alcuni invertebrati come le zanzare e i Copepodi. Per quanto riguarda i virus dell'influenza esistono tre generi di virus influenzali: Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C. Ogni genere include solo una specie: virus dell'influenza A, virus dell'influenza B e virus dell'influenza C (**Tabella 1**). Essi vengono classificati in specie sulla base delle differenze antigeniche nella nucleoproteina (NP) e nella proteina di matrice (M1) che si trovano in ciascun virione.

I virus dell'influenza A sono ulteriormente classificati in sottotipi sulla base dell'antigenicità delle proteine superficiali emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA): sono stati identificati 16 diverse HA e 9 NA (Fouchier *et al.*, 2005) che possono presentarsi in diverse combinazioni (**Tabella 1**). I virus A e C infettano diverse specie (tra cui uomo, suino e uccelli), mentre il virus B infetta quasi esclusivamente l'uomo (**Tabella 1**). I serbatoi naturali dei diversi sottotipi di influenza A sono gli uccelli acquatici migratori dai quali poi l'infezione può essere trasmessa ad uccelli domestici o ad altri animali fino ad arrivare all'uomo. Negli uccelli acquatici sono stati identificati tutti i sottotipi possibili di influenza, nell'uomo, invece, solo alcuni di questi (H1N1, H2N2, H3N2).

Tabella 1. Classificazione dei virus influenzali.

Genere	Specie	Sottotipo	Ospite
Influenzavirus A	Influenza A virus	H 1-16; N 1-9 (H1N1, H1N2, etc.)	Uomo, suino, volatili, cavallo
Influenzavirus B	Influenza B virus		Uomo, foche
Influenzavirus C	Influenza C virus		Uomo, suino

1.1.a Virus dell'influenza A

I virus dell'influenza A causano epidemie annuali e pandemie occasionali che si diffondono a livello mondiale causando gravi danni per la salute dell'uomo. Il virus dell'influenza A verrà trattato nei paragrafi successivi.

1.1.b Virus dell'influenza B

Il virus Influenza B è quasi esclusivamente un patogeno umano ed è meno comune dell'Influenza A. L'unico animale conosciuto, oltre all'uomo, ad essere colpito dall'influenza B sono le foche. Questo tipo di influenza muta ad un tasso da 2 a 3 volte inferiore rispetto al tipo A e questo causa una diversità genetica inferiore, infatti esiste un solo sottotipo di influenza B. Come risultato di questa scarsa diversità antigenica ogni individuo normalmente acquisisce un certo grado di immunità contro l'influenza B, anche se il virus muta in modo tale da impedire un'immunità permanente. Questo ridotto tasso di cambiamento negli antigeni virali, combinato con la scarsa gamma di ospiti, previene la comparsa di pandemie di influenza B (Osterhaus *et al.*, 2000).

1.1.c Virus dell'influenza C

L'influenza C infetta sia l'uomo che i suini (Guo *et al.*, 1983). Studi epidemiologici hanno dimostrato come il virus dell'influenza C sia distribuito in maniera globale sebbene sia principalmente benigno nell'uomo (Taylor, 1949).

1.1.d Nomenclatura

I ceppi influenzali che vengono isolati sono identificati tramite una nomenclatura standard attraverso la quale viene indicato il tipo di virus, la locazione geografica dove è stato isolato per la prima volta, il numero sequenziale di isolamento, l'anno di isolamento e i sottotipi HA e NA per il virus dell'influenza di tipo A.

Alcuni esempi di questa nomenclatura sono:

A/PR/8/34/ (H1N1)

A/Wisconsin/67/05 (H3N2)

B/Lee/40

1.2 Virus dell'influenza A

1.2.a Struttura del virione

La seguente struttura è relativa ai virus dell'influenza A, anche se le altre specie di virus dell'influenza hanno strutture molto simili.

Il virione del virus dell'influenza A è costituito da un envelope lipidico che viene acquisito dal virus dalla membrana plasmatica della cellula ospite durante il processo di gemmazione virale. I virioni rilasciati dalle cellule infettate sono generalmente particelle sferiche di diametro 80-120 nm (**Figura 1**), ma possono essere anche allungate o filamentose con diametro di 20 nm e da 200 a 300 nm di lunghezza.

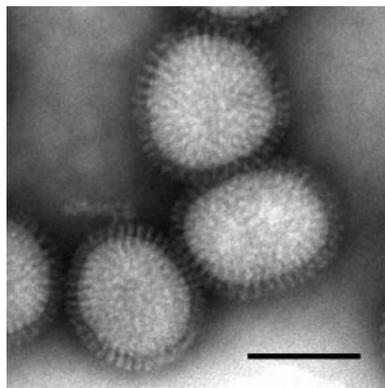


Figura 1. Virioni purificati del virus dell'influenza visualizzati con microscopio elettronico.

Il virus dell'influenza è caratterizzato da un capside elicoidale rivestito da un *envelope* in cui si trovano le glicoproteine HA e NA e la proteina M2 (**Figura 2**). Le due glicoproteine HA e NA costituiscono delle protuberanze che sporgono dalla membrana virale; la proteina M2, una proteina periferica di membrana che costituisce un canale ionico, è una delle proteine virali più abbondanti nel virione. All'interno del capside elicoidale si trova il genoma del virus.

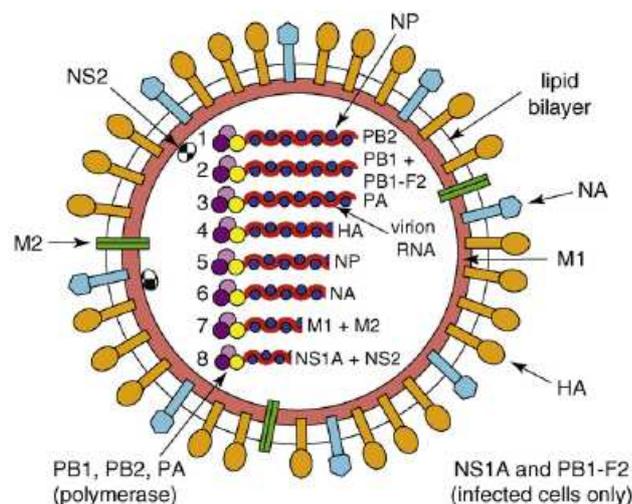


Figura 2. Rappresentazione schematica della struttura del virus dell'influenza A.

1.2.b Organizzazione del genoma

Il genoma del virus dell'influenza A e B è costituito da 8 segmenti di ssRNA a polarità negativa di diverse dimensioni (13,5 migliaia di basi in totale), mentre quello del virus dell'influenza C è costituito da 7 segmenti di ssRNA.

Gli 8 segmenti di RNA del genoma del virus dell'influenza A variano tra le 890 e le 2341 paia di basi (bp).

Ogni segmento di RNA virale (vRNA) è associato a complessi ribonucleoproteici (RNP). I complessi RNP sono costituiti da RNA virale associato alle NP e al complesso eterotrimerico dell'RNA polimerasi RNA-dipendente che si lega alle estremità conservate 3' e 5' di ogni vRNA. Un RNP è costituito da un solo segmento di vRNA, un complesso polimerasico e una NP ogni 20-24 nt dell'RNA virale. L'RNA polimerasi virale è costituita dalla proteina basica 1 (PB1), dalla proteina basica 2 (PB2) e dalla proteina acida (PA). L'RNA polimerasi del virus dell'influenza è responsabile sia della replicazione che della trascrizione virale e utilizza ogni vRNP come template indipendente. Gli RNP, quindi, non l'RNA genomico da solo, sono trascrizionalmente attivi.

Tutti gli 8 segmenti di RNA virale presentano una organizzazione comune: una lunga regione codificante centrale in antisense fiancheggiata da corte sequenze alle estremità 3' e 5' non codificanti conservate che sono parzialmente complementari le une con le altre (Robertson, 1979): i 12 nt al 3' presentano solo una base diversa in metà degli 8 segmenti e i 13 nt al 5' sono completamente conservati. Le estremità complementari hanno un ruolo essenziale nella regolazione della sintesi del vRNA (Fodor *et al.*, 1995): esse si appaiano in una struttura detta *panhandle* che permette l'esposizione delle basi dell'RNA rendendole accessibili alla polimerasi (Cheong *et al.*, 1996, Neumann *et al.*, 2004). La polimerasi si associa alle estremità 3' e 5' del vRNA e catalizza la reazione (Klumpp *et al.*, 1997). Ad ogni segmento di vRNA si associano separatamente molecole di NP formando una struttura a bastone (**Figura 3**). Ogni molecola si associa a 20-24 nt di vRNA (Compans *et al.*, 1972) attraverso il suo scheletro fosfato-zucchero. Dati cristallografici hanno dimostrato che il sito di legame delle NP all'RNA è costituito da molti residui basici ed è localizzato nella parte esterna degli oligomeri di NP (Ye *et al.*, 2006). La NP ha due siti di interazione NP-NP e possiede un'abilità intrinseca di formare la struttura caratteristica degli RNP anche in assenza del vRNA (Ruigrok & Baudin, 1995) suggerendo che la NP sia il determinante maggiore per la formazione della struttura degli RNP e che l'vRNA si associa a uno *scaffold* di NP. Inoltre, da immagini di microscopia elettronica di RNP isolati è stato dimostrato come una singola molecola di RNA polimerasi sia localizzata all'estremità di ogni RNP (Murti *et al.*, 1988; **Figura 3**), dove si associa con le estremità complementari del vRNA.

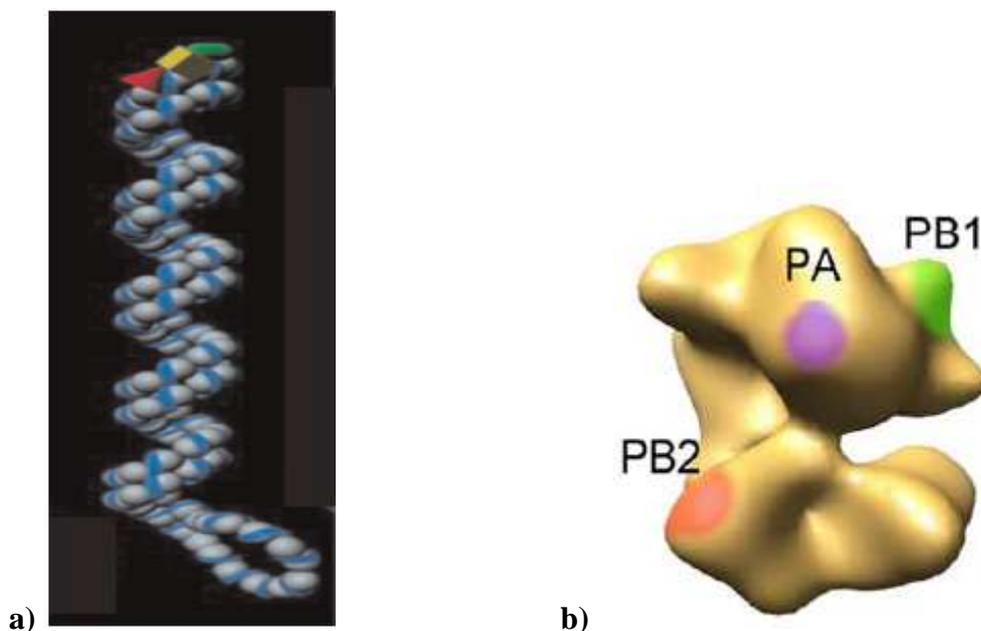


Figura 3. a) Rappresentazione schematica di un RNP. Le tre subunità della RNA polimerasi virale sono rappresentate in giallo rosso e verde. b) Modello tri-dimensionale del complesso della polimerasi virale in RNP: NP in marrone; PA in viola; PB1 in verde e PB2 in rosso (da Coloma *et al.*, 2009).

Gli otto segmenti che costituiscono il genoma virale dell'influenza A codificano 12 proteine (HA, NA, NP, M1, M2, NS1, NEP, PA, PB1, PB1-F2, PB2, N40). Di questi otto segmenti, cinque codificano un solo polipeptide, il segmento 2 codifica tre polipeptidi e i segmenti 7 e 8 codificano entrambi due polipeptidi. Il segmento 2 codifica: PB1, la proteina chiamata PB1-F2 (Chen *et al.*, 2001) e N40 (Wise *et al.*, 2009). Il segmento 7 codifica le proteine di matrice M1 e M2, mentre il segmento 8 codifica la proteina non-strutturale 1 (NS1) e la proteina di esportazione nucleare (NEP).

I tre segmenti più grandi (1, 2, 3) codificano le tre subunità della polimerasi (rispettivamente PB2, PB1 e PA), responsabile della trascrizione e replicazione dell'RNA virale (vedi **Paragrafo 1.3**). Il segmento 1 codifica la proteina PB2 che è una *cap-binding protein* con attività endonucleasica. Il segmento 2 codifica le proteine PB1 (basic protein 1), PB1-F2 e PB1 N40. La proteina PB1 è il cuore della RNA polimerasi RNA-dipendente. Molti ceppi di influenza A, inoltre, esprimono un piccolo polipeptide, di circa 90 aa, denominato PB1-F2 (Chen *et al.*, 2001) generato da una sovrapposizione di *open reading frame* (ORF) al 5' di PB1 (Chen *et al.*, 2001).

PB1-F2 è localizzata nei mitocondri e induce apoptosi in alcuni tipi cellulari (Chen *et al.*, 2001; Gibbs *et al.*, 2003). L'effetto pro-apoptotico della sovraespressione di PB1-F2 suggerisce che esso sia un fattore di virulenza; inoltre, molti studi correlano la perdita di espressione di questa proteina con l'alterazione della patogenicità virale (McAuley *et al.*, 2007; Zamarin *et al.*, 2006). Non è ancora stato dimostrato comunque che l'elevata patogenicità di alcuni ceppi virali osservata *in vivo* sia causata dall'induzione di apoptosi di PB1-F2. Probabilmente PB1-F2 influenza l'attività e la localizzazione intracellulare di PB1 stessa (Mazur *et al.*, 2008). L'espressione di PB1-F2 avviene attraverso una scansione ribosomiale che salta i tre codoni AUG che si trovano a monte del segnale di inizio di PB1-F2 (**Figura 4**; Chen *et al.*, 2001). Sebbene questo non sia stato dimostrato, è plausibile che avvenga dato che né il codone AUG di PB1 né quelli delle due ORF più corte intermedie sono delle sequenze consenso di Kozak forti, mentre lo è quella di PB1-F2 (**Figura 4**). Inoltre, è stato proposto che polipeptidi PB1-F2 più corti siano sintetizzati da uno o più

codoni AUG posti a valle rispetto al codone di inizio di PB1-F2 (Zamarin *et al.*, 2006), ma perché questo si verifichi i ribosomi dovrebbero saltare dei codoni d'inizio prima di iniziare a tradurre l'mRNA, cosa improbabile in quanto essi dovrebbero saltare un minimo di tre codoni AUG più forti (**Figura 4**). Rimangono quindi irrisolte diverse questioni che riguardano la regolazione dell'espressione genica del segmento 2.

Il terzo polipeptide derivante dal segmento 2 è PB1 N40, una variante tronca all'N-terminale di PB1 generata da una traduzione a partire dall'AUG 5 del codone 40 nell'mRNA di PB1. L'espressione di questa proteina è stata identificata in diversi ceppi di influenza A, inclusi quelli umani, equini e aviari, con un livello di espressione pari a circa il 5-10% di PB1 in cellule infettate con il virus A/PR/8/34 wt 8 ore post-infezione (Wise *et al.*, 2009). L'espressione di N40 non è essenziale per la replicazione virale, ma l'espressione di PB1, PB1-F2 e N40 è interdipendente; l'assenza di N40 in presenza di PB1-F2 diminuisce la cinetica di replicazione virale (Wise *et al.*, 2009).

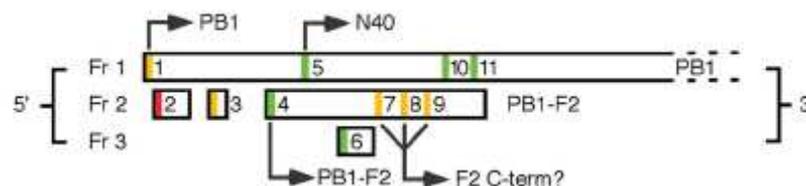


Figura 4. Rappresentazione schematica della regione 5' dell'mRNA del segmento 2. Le ORF nei tre codici di lettura sono indicate da rettangoli. I codoni AUG sono colorati in base alla forza della sequenza consenso di Kozak (verde: forte; giallo: intermedio; rosso: debole). Sono indicati i codoni AUG che identificano l'inizio di ogni polipeptide.

Il segmento 3 codifica la proteina PA, una delle proteine che costituiscono l'eterotrimerico della RNA polimerasi virale (vedi **Paragrafo 1.3**)

I segmenti 4 e 6 codificano le glicoproteine di superficie emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA), coinvolte nel riconoscimento e fusione tra *envelope* virale e membrana cellulare e nel rilascio delle particelle virali di nuova sintesi. HA è una glicoproteina di membrana di tipo I costituita da un'ancora transmembrana idrofobica e da una coda citoplasmatica (Russel *et al.*, 2008). HA è la glicoproteina più espressa, infatti, costituisce l'80% delle proteine dell'*envelope* e trimerizza assumendo forma di spicola (diversa nei 16 tipi di HA). Questa proteina viene modificata post-trascrizionalmente: viene aggiunta una catena acilica nelle tre cisteine della coda citoplasmatica e N-glicosilata nelle sette asparagine del dominio extracellulare. HA è costituita da due subunità: una porzione globulare HA1 (328 aa) e una transmembrana HA2 (221 aa) legate da un legame disolfuro (**Figura 5**; Skehel & Wiley, 2000). Le due subunità giocano ruoli diversi nel processo di entrata del virus nella cellula: HA1 facilita il legame al recettore sulla cellula ospite, mentre HA2 guida la fusione tra membrane. Grazie al riconoscimento da parte della porzione HA1 dell'acido sialico, il virus entra nella cellula ospite passando per l'endosoma. Il pH acido dell'endosoma induce un cambiamento conformazionale in HA2 che permette al peptide fusogeno idrofobico che si trova all'N-terminale di inserirsi nella membrana cellulare (Skehel *et al.*, 1982). Successivamente la porzione C-terminale di HA2 forma una struttura in cui il peptide e l'ancora di membrana di HA si trovano vicine. Questo cambiamento conformazionale permette la fusione tra *envelope* e membrana cellulare (Skehel & Wiley, 2000).

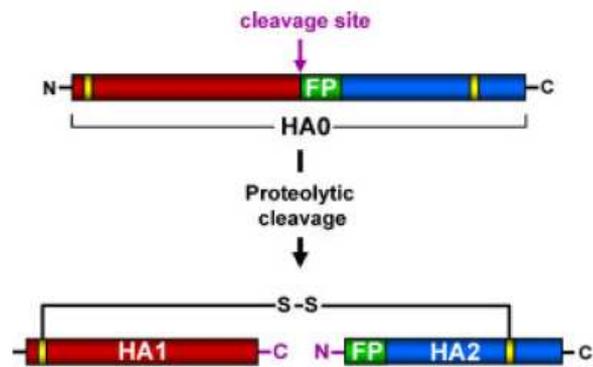


Figura 5. Rappresentazione schematica di HA: dal precursore alla forma matura.

La proteina HA viene inizialmente sintetizzata sotto forma di precursore HA0 (Skehel & Wiley, 2000) incapace di mediare la fusione tra membrane. Per poter svolgere il suo ruolo, HA0 deve essere tagliata in HA1 e HA2 dalle proteasi cellulari del reticolo endoplasmatico (RE; Steinhauer, 1999). Il taglio avviene nella sequenza che collega la subunità HA1 a HA2, che è parzialmente esposta, in due passaggi. In primo luogo un'endoproteasi taglia HA al C-terminale di un'arginina localizzata tra HA1 e HA2 e genera l'N-terminale di HA2 maturo (Klenk & Garten, 1994). Successivamente una carbossipeptidasi rimuove l'arginina e genera il C-terminale di HA1 maturo (Garten & Klenk, 1983). Questo taglio è associato ad un cambiamento conformazionale di HA che permette al peptide fusogeno, in seguito alla stimolazione da pH acido, di inserirsi in una cavità conservata formata da residui di HA1 e HA2 (Chen *et al.*, 1998). Il taglio di HA0 è un importante fattore di virulenza per il virus. L'efficienza di tale taglio dipende dalla presenza di uno o più residui basici nel sito di taglio tra HA1 e HA2.

La neuramidasi (NA) è una glicoproteina di superficie che tetramerizza. NA è in grado di tagliare l'acido sialico delle glicoproteine virali e dei recettori cellulari. L'eliminazione dell'acido sialico dalle proteine virioniche ne previene l'agglutinazione e facilita la liberazione del virus dalle cellule infettate. Inoltre, la proteina NA lega il plasminogeno che, quando viene convertito in plasmina attiva, permette il taglio di HA (Goto & Kawaoka, 1998). I siti di taglio di HA costituiti da un solo residuo carico positivamente possono essere tagliati da uno specifico enzima presente nei polmoni, mentre siti di taglio di HA costituiti da più residui carichi positivamente nel sito di taglio possono essere tagliati in maniera ubiquitaria da proteasi.

Il segmento 5 codifica una proteina basica chiamata nucleoproteina (NP), costituita da 498 aa nei ceppi di influenza A e da 560 aa nei ceppi di influenza B (Londo *et al.*, 1983). Nonostante questa differenza di residui amminoacidici la proteina è altamente conservata tra influenza A e B. Le NP sono coinvolte in diversi legami sia con proteine cellulari che virali e per questo motivo assumono diversi ruoli nella replicazione virale.

Le NP legano, attraverso la porzione N-terminale, l'RNA con alta affinità, ma non in maniera sequenza-specifica (Scholtisscke & Becht, 1971; Digard *et al.*, 1999). In particolare una NP lega 20-24 nt dell'RNA virale (Compans *et al.*, 1972) proteggendolo e mantenendone l'organizzazione delle particelle ribonucleoproteiche (Biswas *et al.*, 1998). Inoltre NP è in grado di legare se stessa; questa interazione è importante, in quanto mantiene la conformazione degli RNP. Il legame con le proteine PB1 e PB2 della polimerasi virale (Biswas *et al.*, 1998) conferisce alle NP la funzione di fattore di processività per la polimerasi stessa importante affinché avvenga la sintesi completa del genoma virale (Honda *et al.*, 1988). E' stata attribuita alle NP la capacità di determinare il

passaggio tra trascrizione e replicazione virale (Beaton & Krug, 1986) e può essere mono-ubiquitinata, regolando il processo di replicazione (Liao *et al.*, 2010). Le NP, inoltre, interagiscono con la proteina M1 (Zvonarjev & Ghendon, 1980) durante il processo di esportazione nucleare dei vRNP. Per quanto riguarda invece l'interazione con le proteine cellulari, NP lega l'importina α (O'Neill & Palese, 1995), in quanto contiene un segnale di localizzazione nucleare (NLS; Neumann *et al.*, 1997); l'actina F (Digard *et al.*, 1999); CRM1 (Elton *et al.*, 2001), per l'esportazione dal nucleo dei vRNP di nuova sintesi, e UAP56, un fattore di splicing coinvolto nella formazione dello spliceosoma e nell'esporto nucleare dell'mRNA (Momose *et al.*, 2001).

Il segmento 7 codifica le proteine di matrice M1 e M2. La proteina M1 è la proteina più abbondante nella particella virale, è una proteina interna al virione che ricopre la superficie interna dell'*envelope* ed è implicata nell'assemblaggio dei virioni di nuova sintesi. M1 forma dimeri e multimeri (Zhao *et al.*, 1998); l'interazione M1-M1 è importante nel *budding* virale. M1 media il legame con vRNP durante il trasporto di questi all'interno della cellula. La proteina M2 è una proteina transmembrana di tipo III che tetramerizza. Il dominio transmembrana di M2 forma un canale che agisce come canale ionico selettivo (Pinto *et al.*, 1992). L'apertura del canale ionico M2 permette ai protoni di entrare acidificando il core virale. Questa funzione di M2 è importante nelle prime fasi dell'infezione in quanto provoca l'abbassamento di pH che permette il cambiamento conformazionale di HA promuovendone il processo di fusione; inoltre M2 è implicata nel rilascio dei nuovi virioni.

Il segmento 8 codifica due proteine: la proteina NS1 e la proteina NEP (Lamb *et al.*, 1980). La proteina NS1 è l'unica proteina a non essere incorporata nel virione ed è responsabile dello *splicing* dell'mRNA virale. Questa proteina, inoltre, inibisce la risposta cellulare antivirale dell'interferone α e β (INF α/β) bloccando il processamento post-trascrizionale dei pre-mRNA cellulari antivirali. NS1 è in grado, inoltre, di bloccare la risposta cellulare antivirale mediata da protein chinasi R (PKR; Bergmann *et al.*, 2000) attraverso il legame a questa proteina.

NS2 è meno caratterizzata rispetto a NS1. Essa è una proteina di esporto nucleare e funge da adattatore tra la regione cromosomica di mantenimento 1 (Crm1) e gli RNP virali (O'Neill *et al.*, 1998). NS2 interagisce anche con la proteina M1 (Yasuda *et al.*, 1993), la quale a sua volta interagisce con gli RNP virali (Noton *et al.*, 2007). E' stato dimostrato, infatti, che la porzione C-terminale di M1 interagisce con le NP, la porzione N-terminale delle NP interagisce con la porzione C-terminale di NEP/NS2 e infine che la porzione N-terminale di NEP/NS2 interagisce con Crm1; tutte queste interazioni permettono l'esporto nucleare degli RNP virali (Boulo *et al.*, 2007).

1.2.c Ciclo replicativo

L'entrata del virus nella cellula ospite avviene tramite legame della glicoproteina virale di superficie HA con l'acido sialico che si trova sulla superficie della membrana cellulare (**Figura 7**; Skehel *et al.*, 2000). L'acido sialico può essere legato al galattosio in conformazione α (2-3) o α (2-6). Questi legami sono estremamente importanti nel determinare la specie-specificità di legame di un particolare ceppo di influenza. I virus che infettano l'uomo riconoscono, infatti, l'acido sialico con legame α (2-6), mentre quelli che infettano gli uccelli riconoscono l'acido sialico con legame α (2-3). I virus in grado di infettare i maiali riconoscono entrambi i tipi di acido sialico (Skehel *et al.*, 2000). In

seguito al legame HA-acido sialico, il virus entra nella cellula ospite per endocitosi mediata da recettore e viene internalizzato in vescicole endosomiali. Il pH acido dell'endosoma (pH 5/6) permette la fusione tra membrana virale ed endosoma, in quanto induce il cambiamento conformazionale di HA0, che mantiene il dominio di legame al recettore HA1 ma espone il peptide di fusione di HA2. Questo peptide si inserisce nella membrana endosomiale facendo in modo che membrana virale e endosomiale siano in contatto tra di loro. L'ambiente acido dell'endosoma, inoltre, fa sì che si aprano i canali ionici M2. L'apertura del canale ionico M2 permette ai protoni di entrare acidificando il core virale. Il pH acido fa sì che la proteina M1 cambi conformazione, causando la rottura dell'interazione tra M1-vRNP e quindi il rilascio dei vRNP da M1. I vRNP sono così liberi di entrare nel citoplasma cellulare (Sidorenko & Reichi, 2003).

Replicazione e trascrizione virale avvengono nel nucleo della cellula ospite (Jackson *et al.*, 1982). I vRNP devono essere quindi trasportati nel nucleo attraverso i pori nucleari. Le proteine virali necessarie affinché avvengano replicazione e trascrizione (NP, PA, PB1 e PB2) contengono delle sequenze di localizzazione nucleare (NLS) in grado di legare il macchinario cellulare di importo al nucleo e permettere l'entrata delle vRNP. L'importo al nucleo avviene grazie alla via cellulare proteina-dipendente della regione cromosomica di mantenimento 1 (Crm1) attraverso legame con le importine α e β coinvolte nell'importo nucleare. In particolare, le proteine PA e PB1 interagiscono formando un complesso nel citoplasma e successivamente traslocano nel nucleo dove si associano a PB2 (Nieto *et al.*, 1994).

Nel nucleo cellulare sono sintetizzati tre diversi tipi di RNA: l'RNA messaggero (mRNA) a polarità positiva, l'RNA complementare (cRNA) a polarità positiva e l'RNA virale (vRNA) a polarità negativa.

La sintesi dell'mRNA è diretta dalla polimerasi virale e ha luogo durante le fasi iniziali dell'infezione. La trascrizione è *primer*-dipendente. L'innescò per la sintesi dell'mRNA è costituito dal cap 5' 7-metil-guanosina (m^7G) del pre-mRNA cellulare. Gli mRNA cellulari infatti sono dotati di cap metilato al 5' e coda di poly (A) al 3', mentre il genoma virale è privo del cap al 5' (Plotch *et al.*, 1976). Il riconoscimento e il legame di questa struttura cellulare avviene ad opera della subunità PB2 prima venga esportata nel citoplasma. Il taglio del cap dal pre-mRNA cellulare viene effettuato dall'endonucleasi PA che genera frammenti di 10-15 ribonucleotidi. Questi oligomeri vengono quindi utilizzati come inneschi per la trascrizione degli mRNA virali (Krug *et al.*, 1979). Tale meccanismo è chiamato *cap-snatching* ed è caratteristico dei virus a polarità negativa appartenenti alle famiglie *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae* e *Arenaviridae*. Anche se non è noto il momento esatto in cui avviene questo meccanismo quello che si sa è che la polimerasi predilige il legame con l'RNA polimerasi cellulare II (Pol II) fosforilata in posizione 5'. Questa fosforilazione avviene durante l'inizio della trascrizione nel momento in cui si attiva la sintesi del complesso del cap cellulare (Engelhardt *et al.*, 2005).

Anche la terminazione della trascrizione avviene ad opera della polimerasi virale, la quale rimane legata al 5' del templatò a causa della formazione della struttura *panhandle* assunta dal vRNA stesso (Fodor *et al.*, 1994) e aggiunge un segnale di poli-adenilazione (poly-A) al 3' grazie ad un segnale oligo-U (da 5 a 7 U) che si trova 17 nucleotidi a valle del 5' terminale (Robertson *et al.*, 1981). Il meccanismo di trascrizione del virus dell'influenza differisce da quello dei virus a RNA a polarità negativa non segmentati nel processo che riguarda il cap al 5' e il poly-A al 3'.

Il virus dell'influenza sfrutta il macchinario di *splicing* dell'ospite per generare le proteine M2 e NS2, che vengono prodotte in quantità minori rispetto alle proteine che non necessitano di *splicing* M1 e NS1 (Amorim & Digard, 2006). Per poter utilizzare il

macchinario di *splicing* della cellula ospite, il virus è in grado di inibire lo *splicing* dell'mRNA cellulare (Engelhardt & Fodor, 2006): la proteina NS1 lega U6, un piccolo RNA nucleare (snRNA; Lu *et al.*, 1994), e altri componenti del macchinario di *splicing* causandone la rilocalizzazione nel nucleo della cellula infettata (Fortes *et al.*, 1995). La proteina NP, invece, interagisce con UAP56, un fattore di *splicing* coinvolto nella formazione dello spliceosoma e nell'esporto nucleare dell'mRNA (Momose *et al.*, 2001). L'mRNA viene successivamente esportato dal nucleo al citoplasma passando attraverso i pori nucleari.

Lo *switch* tra trascrizione e replicazione è diretto dalle NP, in quanto esse sono in grado di promuovere l'inizio della trascrizione e bloccare la sintesi del mRNA virale (Newcomb *et al.*, 2008). La replicazione del genoma virale avviene in fasi successive alla trascrizione ed è *primer*-indipendente. Le estremità 5' e 3' del genoma sono complementari e invertite e quindi in grado di interagire tra di loro formando una struttura detta *panhandle* (Luo *et al.*, 1991). La replicazione del genoma virale (cRNA e vRNA) richiede la formazione del complesso *panhandle* (Luo *et al.*, 1991) e la presenza delle subunità PB1 e PA della polimerasi che legano l'estremità 5' del vRNA o cRNA (Poon *et al.*, 1998). La proteina PA aumenta l'affinità di PB1 per il 5' vRNA agendo da fattore di elongazione (Fodor *et al.*, 2003). La sintesi *de novo* del vRNA richiede che venga prima sintetizzato l'RNA complementare (cRNA) che funge da template *full-length* per la produzione della progenie del vRNA (Lee *et al.*, 2002). Di recente è stato dimostrato che la replicazione del genoma virale coinvolge più di un complesso della polimerasi in grado di agire *in trans* (Jorba *et al.*, 2009). A differenza del vRNA, il cRNA non ha il poly(A) al 3' nè il cap al 5'.

La sintesi delle proteine virali avviene nel citoplasma cellulare grazie ai ribosomi (polisomi). Il virus sfrutta il macchinario traduzionale dell'ospite, infatti, la velocità di produzione delle proteine cellulari diminuisce nel momento in cui ha inizio l'infezione virale. La polimerasi, le proteine di matrice e le proteine non strutturali di nuova sintesi sono trasportate al nucleo dove avvengono trascrizione e replicazione ad opera della polimerasi e *splicing* delle proteine M e NS. Le proteine dell'*envelope* (M2, HA e NA) vengono sintetizzate nei ribosomi del RE, inserite nella membrana del RE, glicosilate e trasportate al Golgi. La proteina M2 forma un canale protonico che previene l'acidificazione del Golgi e di altre vescicole impedendo il cambiamento conformazionale e l'inattivazione di HA. Successivamente vengono trasportate alla membrana della cellula ospite (Sidorenko & Reichi, 2003).

Le nuove particelle ribonucleoproteiche vengono quindi sintetizzate nel nucleo cellulare e successivamente esportate nel citoplasma passando attraverso i pori nucleari grazie alla via Crm1-dipendente (Elton *et al.*, 2001), alle proteine virali M1 (Bui *et al.*, 1996; Bui *et al.*, 2000), alla proteina di esporto nucleare (NEP/NS2; O'Neill *et al.*, 1998) e alle NP. La proteina M1 lega, infatti, i vRNP attraverso la porzione C-terminale, formando il complesso M1-vRNP (Baudin *et al.*, 2001), e ne catalizza l'esporto dal nucleo al citoplasma diretto dalla proteina NS2 e dalle NP contenenti un segnale NES. La porzione N-terminale di M1 contiene un NLS. Per l'esportazione dal nucleo, M1 lega la proteina di esporto nucleare (NEP/NS2) attraverso l'N-terminale mascherando l'NLS, e NEP media il legame Ran GTP-dipendente con la proteina cellulare CRM1 permettendo l'esporto dei vRNP (Boulo *et al.*, 2007).

E' stato proposto che ci siano due diverse classi di vRNP: una coinvolta attivamente nella trascrizione e replicazione, che non viene esportata dal nucleo, e una che rimane trascrizionalmente inattiva e che viene esportata dal nucleo per essere incorporata nei nuovi virioni. Probabilmente è il legame di M1 con i vRNP che li rende trascrizionalmente inattivi (Hankins *et al.*, 1990).

La proteina M1, inoltre, inibisce il reimporto al nucleo dei vRNP. Il complesso vRNP-M1 viene trasportato al sito di gemmazione intracellularmente grazie all'interazione con le componenti citoscheletriche, in particolare i microfilamenti, mentre le proteine transmembrana HA, NA e M2 vengono trasportate sulla membrana plasmatica apicale mediante la via standard di esocitosi cellulare (Wandinger-Ness *et al.*, 1990). La posizione di M1 nella struttura virale implica che M1 formi un ponte tra *envelope* e vRNP e che interagisca con le proteine virali M2, HA, NA poste sulla membrana plasmatica permettendo l'impacchettamento delle particelle virali (McCown & Pekosz, 2005). Le glicoproteine virali quindi determinano il sito di assemblaggio e di *budding* del virus dato che esse contengono segnali apicali o basolaterali e sono dirette verso uno specifico sito dove il virus si assembla e gemma in cellule epiteliali polarizzate. La gemmazione richiede la presenza di proteine cellulari che sono richiamate da M1. L'elica 6 (H6) di M1, infatti, possiede un dominio L implicato nel richiamo di queste proteine, anche se non è ancora noto quali proteine interagiscano con il dominio L (Hui *et al.*, 2006).

La segmentazione del genoma del virus aumenta la complessità del processo di assemblaggio del virione. Il modo in cui avviene l'impacchettamento del genoma virale è ancora motivo di discussione. Esistono due modelli maggiormente accreditati chiamati *random model* e *specific packaging model*. Il *random model* prevede un meccanismo che distingue genoma virale da RNA cellulare e RNA virale non-genomico in modo che solo il genoma virale venga incorporato nei virioni. Questo processo però non permette di distinguere i diversi segmenti virali, per cui potrà verificarsi che in uno stesso virione siano presenti due segmenti uguali (Compans *et al.*, 1970). Il secondo modello, *specific packaging model*, invece, è un meccanismo che assicura che sia presente una sola copia di ciascun segmento per virione in quanto durante l'assemblaggio ogni segmento viene selezionato in maniera specifica (Kingsbury, 1970). Le sequenze UTR conservate di ciascun segmento contengono un segnale di *packaging* generale bipartito; questo segnale potrebbe essere importante per entrambi i modelli: nel primo in quanto permetterebbe di distinguere l'RNA genomico virale dal non-genomico o da quello cellulare; nel secondo di distinguere i diversi segmenti di RNA virale. Anche come avvenga l'interazione degli RNP è oggetto di speculazione. I diversi RNP potrebbero interagire tra di loro attraverso interazione diretta RNA-RNA (**Figura 6a**; Fujii *et al.*, 2003) o attraverso proteine non identificate che fungono da ponte tra i due (**Figura 6b**; Brodersen *et al.*, 2002). Inoltre gli 8 RNP interagiscono tra di loro utilizzando il minor numero di interazioni possibili prima di essere impacchettati nel virione; questa interazione potrebbe avvenire in due modi diversi. Il primo modo, chiamato *daisy chain*, prevede l'interazione di un RNP con due diversi RNP (**Figura 6c**); il secondo, detto *master segment*, invece, prevede che un RNP interagisca con tutti gli altri (**Figura 6d**); i segmenti più accreditati per costituire il *master segment* sono i segmenti 1 e 7.

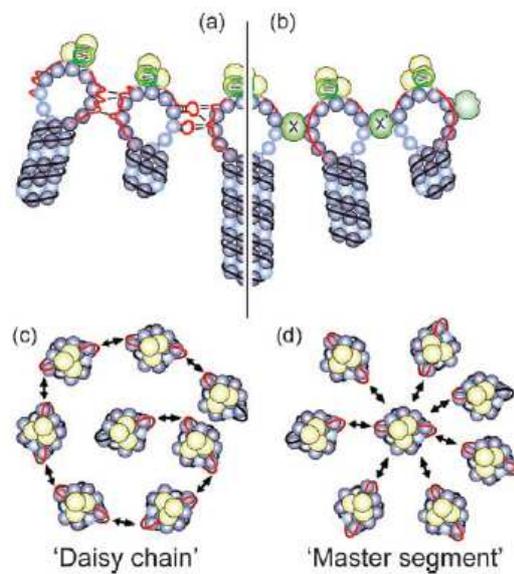


Figura 6. Modello delle possibili interazioni tra RNP nel processo di impacchettamento delle particelle virali: **a)** interazione diretta RNA-RNA tra sequenze di impacchettamento; **b)** interazione mediata da proteine non identificate; **c, d)** possibile organizzazione del complesso genomico (da Hutchinson *et al.*, 2010).

Una volta che tutte le componenti virali sono assemblate in virioni, essi possono gemmare dalla membrana plasmatica (**Figura 7**). Questo processo determina la grandezza e la forma della particella virale. Anche se non è stato ancora ben chiarito come questo avvenga, sembra che fattori virali e cellulari ne siano coinvolti. Il rilascio delle particelle virali richiede la presenza di NA (Palese & Compans, 1976) che rimuove l'acido sialico da glicolipidi e glicoproteine delle particelle virali e delle cellule infettate prevenendo l'aggregazione tra particelle virali e il loro riattacco a cellule già infettate.

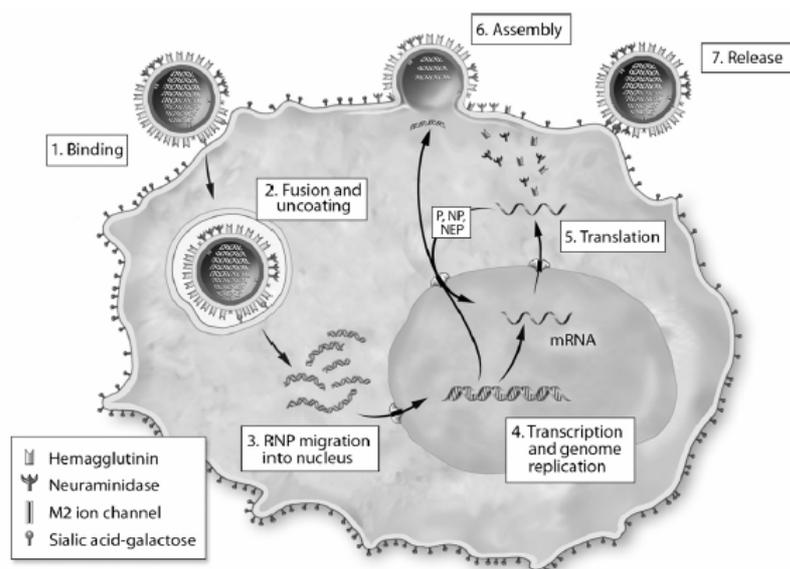


Figura 7. Rappresentazione schematica del ciclo di replicazione virale.

1.3 Il complesso della RNA polimerasi virale

L'RNA polimerasi RNA-dipendente del virus dell'influenza ha un ruolo cruciale nel ciclo di replicazione virale.

Il complesso della polimerasi (250 kDa) è un eterotrimerico costituito da tre diverse subunità (PA, PB2, PB1) in rapporto stechiometrico 1:1:1 che interagiscono tra di loro (**Figura 8**). In particolare la subunità PB1 interagisce sia con PB2 che con PA, mentre PB2 e PA non interagiscono tra di loro.

Queste tre proteine insieme alle NP sono essenziali affinché avvengano replicazione ed espressione virale (Huang *et al.*, 1990).

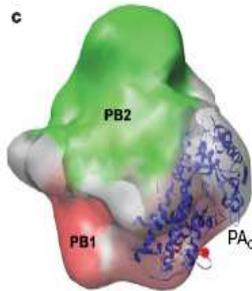


Figura 8. Modello della struttura del complesso della RNA polimerasi (da He *et al.*, 2008).

La subunità PA (78 kDa) è costituita da due domini, identificati mediante digestione con tripsina: un dominio N-terminale di 25 kDa e uno C-terminale di 55 kDa (Hara *et al.*, 2006) separati da un *linker* peptidico di 20 aa che gioca un ruolo importante nella stabilità dell'interazione con PB1 (Guu *et al.*, 2008; **Figura 9**). La presenza di un *linker* di connessione tra il dominio N- e C-terminale determina una flessibilità conformazionale della subunità PA, cosa che potrebbe avere un ruolo nella regolazione delle funzioni della polimerasi (Kawaguchi *et al.*, 2005).

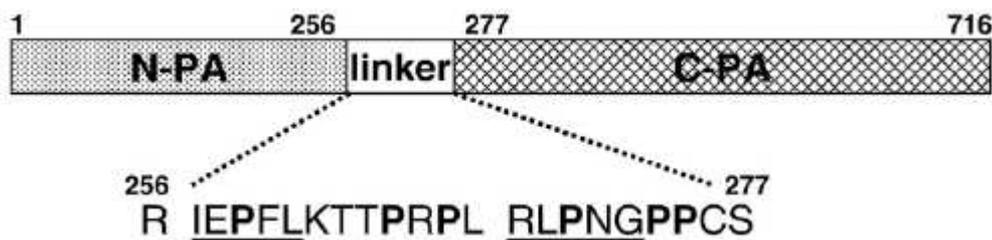


Figura 9. Diagramma schematico della subunità PA.

Sono state cristallizzate di recente sia la porzione C-terminale che N-terminale di PA. La porzione N-terminale di PA è stata risolta in parallelo da due diversi gruppi di ricerca, entrambi hanno identificato un'architettura α/β : 5 foglietti β e 7 α eliche (Dias *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). La porzione centrale di questo dominio possiede una struttura simile a quella di una endonucleasi di restrizione di tipo II e più generalmente alla famiglia PD-(D/E)XK delle nucleasi, sebbene ne differisca nella porzione periferica. Il gruppo di Yuan *et al.* ha cristallizzato il dominio in presenza di ioni Mg^{2+} e identificato uno ione legato al residuo acido conservato situato nella cavità carica negativamente. Sono stati identificati 6 aa responsabili della coordinazione dello ione Mg^{2+} che sono conservati tra i virus

dell'influenza A, B e C ad eccezione di uno solo di questi. Attraverso analisi di tipo funzionale, essi hanno dimostrato che mutazioni nei residui che coordinano lo ione Mg^{2+} causano la perdita di attività di *cap-snatching* pur mantenendo l'attività replicativa del virus (Yuan *et al.*, 2009). Il gruppo di Dias *et al.*, invece, ha cristallizzato il dominio in presenza di ioni Mn^{2+} e localizzato due ioni Mn^{2+} nella cavità acida (Dias *et al.*, 2009). Uno di questi due ioni si trova nella posizione dello ione Mg^{2+} della struttura del gruppo di Dias e l'altro in un secondo sito localizzato a una distanza di 4 Å, caratteristico di un meccanismo catalitico a due metalli. Dias *et al.* hanno dimostrato, inoltre, che questo dominio possiede un'attività endonucleasica nei confronti sia dell'RNA che del DNA a singolo filamento che dipende dalla presenza di ioni Mn^{2+} , Co^{2+} o Mg^{2+} . Sulla base di queste osservazioni, entrambi i gruppi hanno localizzato l'attività endonucleasica di *cap-snatching* nel dominio N-terminale di PA, contrariamente a quanto riportato in precedenza (Li *et al.*, 2001).

La porzione N-terminale di PA contiene un NLS che dirige il trasporto di PB1 dal citoplasma al nucleo (Nieto *et al.*, 1994). Inoltre è stato dimostrato che la sovra-espressione di PA induce degradazione di NP e PB2, suggerendo che PA abbia funzione proteolitica (Sanz-Ezquerro *et al.*, 1996). Infatti Hara *et al.* hanno definito PA come serin-proteasi con il sito attivo localizzato in posizione 624 (Hara *et al.*, 2001). Mutazioni puntiformi nella regione N-terminale di PA interferiscono con il legame al promotore nel cRNA, suggerendo che questa regione di PA possa avere un ruolo nella regolazione del legame al promotore (Lee *et al.*, 2002); inoltre questa subunità è in grado di aumentare l'attività della polimerasi virale aumentandone il legame al promotore (Kashiwagi *et al.*, 2009). Infine PA può essere fosforilata (Sanz-Ezquerro *et al.*, 1998), ma non è stato dimostrato se queste sue modifiche post-traduzionali giochino un ruolo nell'attività proteasica o nella sintesi dell'RNA.

Il dominio C-terminale di PA, invece, è responsabile dell'interazione con la subunità PB1. In particolare i 25 residui N-terminali di PB1 interagiscono con la porzione C-terminale di PA (Gonzales *et al.*, 1996; Ohtsu *et al.*, 2001; Perez e Donis *et al.*, 1995; Toyoda *et al.*, 1996; Zurcher *et al.*, 1996). Questo è stato dimostrato di recente utilizzando un peptide corrispondente ai 25 aa N-terminali di PB1 in grado di inibire l'attività polimerasica e la replicazione virale (Ghanem *et al.*, 2007; Wunderlich *et al.*, 2009). Sulla base di queste informazioni, due gruppi di ricerca hanno determinato la struttura cristallografica della porzione C-terminale di PA complessata con il frammento N-terminale di PB1 (Obayashi *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008). Dalla struttura cristallografica è emerso che il dominio C-terminale di PA è costituito da 13 α eliche e 9 foglietti β (**Figura 10**).

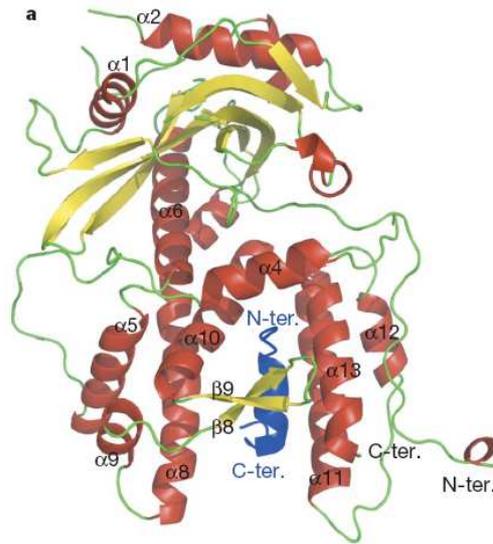


Figura 10. Struttura cristallografica del dominio C-terminale di PA (in rosso) legato al frammento N-terminale di PB1 (in blu; da Obayashi *et al.*, 2008).

Il frammento di PB1, che è completamente conservato tra i ceppi di influenza umana e aviaria, si inserisce in una cavità idrofobica formata dalla porzione C-terminale di PA, anch'essa conservata tra i diversi ceppi di influenza. Il frammento di PB1 interagisce con PA attraverso legami idrogeno e idrofobici. Dalla struttura cristallografica, inoltre, è stato possibile identificare i residui di PB1 e PA implicati nel legame (**Figura 11**); in particolare gli aa P_{TLLFL} di PB1, corrispondenti ai residui 5-10, sono cruciali per l'interazione con residui non sequenziali di PA.

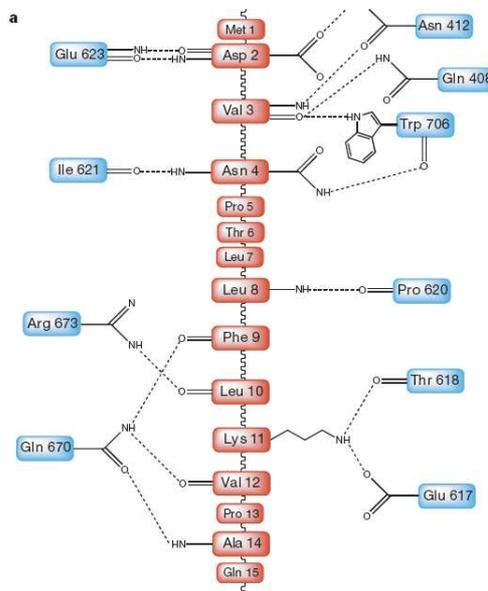


Figura 11. Rappresentazione schematica delle interazioni tra PA (in blu) e PB1 (in rosso). Le linee tratteggiate rappresentano i legami a idrogeno.

La subunità PB1 (83 kDa) è il cuore della RNA polimerasi virale, in quanto catalizza l'aggiunta di nucleotidi durante l'elongazione del trascritto di RNA (Biswas & Nayak, 1994). Questa subunità contiene domini conservati A-D comuni a tutte le RNA polimerasi

RNA-dipendenti e alle DNA polimerasi RNA-dipendenti (Poch *et al.*, 1989). Ad oggi non sono state risolte strutture cristallografiche di RNA polimerasi RNA-dipendenti con RNA a polarità negativa, sebbene siano note strutture di RNA polimerasi RNA-dipendenti con RNA a polarità positiva. Adiacenti a queste regioni conservate si trovano due siti di legame per i nucleotidi coinvolte in un meccanismo di aggiunta per i nucleotidi (Asano & Ishihama, 1997).

I siti di legame al 5' e 3' del vRNA e cRNA si trovano sulla subunità PB1 (Fodor *et al.*, 1993; Gonzales & Ortin, 1999). La porzione C-terminale di PB1 è coinvolta nel legame al promotore del RNA virale, in quanto mutazioni in alcuni residui nella porzione C-terminale di PB1 (aa 668-674) inibiscono il processo di sintesi dell'mRNA a causa di una riduzione nel legame al promotore del vRNA e al cap dell'RNA (Kerry *et al.*, 2008). Ciò suggerisce che questa regione sia coinvolta nella regolazione della trascrizione dell'mRNA virale.

La subunità PB1, inoltre, funge da congiunzione tra le subunità PB2 e PA, infatti, interagisce attraverso l'estremità N- e C-terminale rispettivamente con PA e PB2. Analisi mutazionali hanno dimostrato che la porzione C-terminale di PB1 (residui 712-746) interagisce con la porzione N-terminale di PB2 (Gonzales *et al.*, 1996; Poole *et al.*, 2007; Toyoda *et al.*, 1996, Perales *et al.*, 1996). Entrambe le regioni di interazione di PB1 sono state risolte a livello cristallografico: i residui 1-25 di PB1 complessati con la subunità C-terminale di PA (Obayashi *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008; vedi sopra **Figura 10**) e i residui 678-757 di PB1 complessati con la regione N-terminale di PB2 (Sugiyama *et al.*, 2009; **Figura 12**).

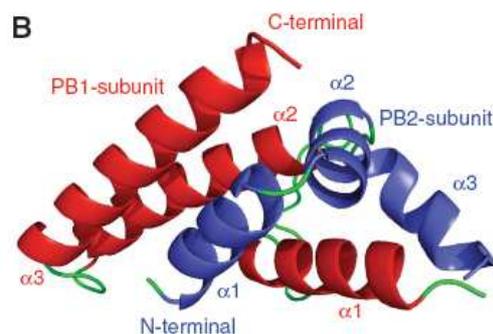


Figura 12. Struttura cristallografica del dominio C-terminale di PB1 (in rosso) legato al frammento N-terminale di PB2 (in blu; da Sugiyama *et al.*, 2009).

Sia il frammento C-terminale di PB1 che quello N-terminale di PB2 sono costituiti da tre α eliche. I frammenti di PB2 e PB1 interagiscono tra di loro attraverso legami idrogeno, contatti apolari e ponti salini. Il legame PA/PB1 è principalmente di carattere idrofobico; quello PB1/PB2, invece, è costituito da interazioni polari. La maggior parte dell'energia di interazione tra PB1 e PB2 è data dall'elica 1 di PB2 e dai legami apolari tra le due subunità. Dalla struttura cristallografica è stato possibile identificare i residui di PB1 e PB2 implicati nel legame (**Figura 13**).

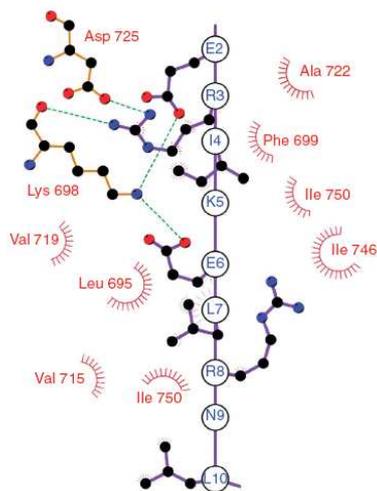


Figura 13. Rappresentazione schematica delle interazioni tra PB2 (rappresentata linearmente) e PB1 (rappresentata a semicerchi). Le linee tratteggiate rappresentano i legami idrofobici.

Le interfacce di interazione della subunità sono essenziali per la funzione polimerasica e mutazioni in questi residui causano inibizione nella replicazione e nella trascrizione virale dimostrando un ruolo fondamentale per l'interazione PB1/PB2. La regione centrale di PB1, invece, contiene i motivi conservati delle polimerasi RNA-dipendenti (Poch *et al.*, 1989). Questa regione non è stata risolta cristallograficamente.

La subunità PB2 (83 kDa) è implicata nella trascrizione dell'RNA virale. Questa proteina è coinvolta nel riconoscimento e legame del cap in 5' (m^7GTP) del pre-mRNA cellulare attraverso la porzione N-terminale (Gastamiza *et al.*, 2003). Il cap cellulare viene successivamente tagliato in un sito specifico dalla subunità endonucleasica PA generando 10-13-meri utilizzati come *primers* per la trascrizione del mRNA virale. PB2 quindi viene definita *cap-binding protein*, infatti la sua struttura cristallografica ha dimostrato come questa proteina assuma la stessa conformazione di proteine che legano il cap come la proteina cellulare eIF4E (Marcotrigiano *et al.*, 1997) e la proteina di vaccinia virus VP39 (Hodel *et al.*, 1998).

La proteina PB2, inoltre, lega NP in due siti distinti (Poole *et al.*, 2004).

Sono stati cristallizzati 4 diversi domini di PB2. Il primo comprende la porzione di PB2 responsabile dell'interazione con PB1 (vedi sopra; Sugiyama *et al.*, 2009). Il secondo dominio comprende i residui 678-759 della porzione C-terminale di PB2, definita dominio NLS in quanto contiene sequenze bipartite di localizzazione nucleare (736-RXXR₁₂KRIR-755): mutazioni in questo dominio bloccano il trasporto al nucleo di PB2 (Tarendeau *et al.*, 2007). La struttura di questo dominio complessata con l'importina umana $\alpha 5$ è stata determinata mediante NMR (Tarendeau *et al.*, 2007).

Il terzo dominio comprende i residui 320-483 ed è un dominio in grado di assumere la propria conformazione indipendentemente dal resto della proteina. Questo dominio comprende il sito di legame per il cap in 5' dell'mRNA ed è stato cristallizzato complessato con il m^7GTP (Guilligay *et al.*, 2008). Dalla struttura cristallografica sono stati determinati i residui di PB2 conservati tra i ceppi di influenza A in grado di riconoscere la guanina metilata.

L'ultimo dominio comprende i residui 538-678, che includono il residuo 627 importante nella specificità dell'ospite (Tarendeau *et al.*, 2008). Questo residuo corrisponde ad una lisina nell'uomo (tranne nel ceppo pandemico H1N1 del 2009) e ad un acido glutammico

negli uccelli. La mutazione E627K causa un aumento dell'attività polimerasica e quindi un aumento della replicazione virale.

1.4 Evoluzione del virus dell'influenza

L'RNA polimerasi virale trascrive e replica l'RNA genomico, ma non possiede attività di correttore di bozze. Questo comporta un'elevata capacità di inserire mutazioni nel genoma pari a circa un errore per ogni ciclo replicativo (Drake, 1993); conseguentemente quasi ogni nuova particella virale contiene una mutazione nel suo genoma. Questo fenomeno prende il nome di *antigenic drift* (Moya *et al.*, 2004) e riguarda in particolare le glicoproteine. Questa caratteristica è importante nella strategia evolutiva del virus, infatti, ad esempio, il continuo cambiamento nella sequenza dell'HA permette al virus di evadere la risposta anticorpale dell'ospite. Inoltre un altro vantaggio evolutivo deriva dal fatto che il genoma del virus è segmentato permettendo il mescolamento o il riassortimento dei geni quando segmenti di diversi virus umani e animali che coinfettano la stessa cellula ospite sono impacchettati in una nuova particella virale antigenicamente diversa da quelle di partenza e potenzialmente in grado di generare pandemie (Webster *et al.*, 1992). Questo processo di riassortimento dell'RNA genomico viene chiamato *antigenic shift*. La generazione di virus riassortanti contenenti geni provenienti da virus aviari e umani può avvenire nei suini in quanto essi possono essere infettati da entrambi i virus, dato che contengono acido sialico sia con legame α (2-3) che α (2-6). In seguito a riassortimento, un virus aviario può evolvere in un patogeno umano attraverso ricombinazione di HA in grado di funzionare efficientemente in cellule umane (Van Hoven *et al.*, 2009). Se il virus risultante è immunologicamente distinto da quelli passati può essere un ceppo pandemico contro cui la popolazione non è immunologicamente protetta.

I virus di tipo A sono i più virulenti tra i tre tipi di influenza e provocano le patologie più gravi. Il virus dell'influenza B non può, invece, andare incontro ad *antigenic shift* poiché esso è in grado di infettare solo gli uomini.

I sottotipi del virus dell'influenza A che sono stati identificati come altamente patogeni per l'uomo sono riportati in **Tabella 2** e rappresentano i ceppi che hanno causato pandemie nel passato.

Tabella 2. Pandemie causate dal virus dell'influenza A.

Nome della Pandemia	Data	Decessi	Sottotipo coinvolto
Influenza asiatica (russa)	1889-90	1 milione	forse H2N2
Influenza spagnola	1918-20	40 milioni	H1N1
Influenza asiatica	1957-58	1-1,5 milioni	H2N2
Influenza di Hong Kong	1968-69	0,75-1 milioni	H3N2

1.5 Determinanti di patogenicità del virus dell'influenza

I virus dell'influenza aviaria si classificano in virus ad alta patogenicità (HPAI: highly pathogenic avian influenza) che causano mortalità nel 100% dei casi e in virus a bassa patogenicità (LPAI: low pathogenic avian influenza) che invece provocano sintomi minori. I fattori che causano patogenicità sono molteplici e riguardano le proteine HA, PB2 e NS1. La proteina HA, come detto in precedenza, è costituita dalle due subunità HA1 e HA2 legate da un *linker* che viene tagliato da proteasi cellulari per generare HA matura. Nei ceppi LPAI il *linker* contiene un solo residuo di arginina che può essere tagliato da determinate proteasi del tratto respiratorio e gastrointestinale, nei ceppi HPAI invece il *linker* è costituito da diverse arginine con sequenza RXR/K-R che può essere tagliato da proteasi espresse ubiquitariamente (Bosch *et al.*, 1981; Webster, 1987). Non tutti i ceppi pandemici del passato presentano comunque questa caratteristica degli HPAI (Reid *et al.*, 1999).

Alcuni residui della subunità PB2 della polimerasi virale sono importanti fattori che determinano la patogenicità del virus. Il residuo 627, ad esempio, è particolarmente importante. Questo residuo è un acido glutammico nei virus aviari e una lisina nei virus che infettano i mammiferi. Mutazioni E627K aumentano l'attività polimerasica del virus. Inoltre è stato dimostrato che anche mutazioni T271A aumentano l'attività polimerasica: in particolare questa mutazione non aumenta la patogenicità virale, ma il titolo del virus (Bussey *et al.*, 2010). Il ceppo pandemico del 2009 (H1N1 suino) presenta questa mutazione. Anche il residuo 701 di PB2 è un determinante patogenetico virale; questo residuo generalmente è un aspartato, ma mutazioni D701N influenzano la dinamica dell'*import* nucleare di PB2 modulandone l'interazione con l'importina α (Gabriel *et al.*, 2008).

Inoltre generalmente i virus pandemici HPAI codificano la proteina pro-apoptica PB1-F2.

Il virus H5N1 ha tutte le caratteristiche sopra citate, che ne comportano l'elevata patogenicità.

1.6 Epidemiologia e patogenesi delle infezioni da virus dell'influenza

Il virus dell'influenza A causa infezioni alle vie aeree superiori caratterizzate da alta morbilità e mortalità soprattutto nella popolazione ad alto rischio quali persone immunocompromesse e trapiantati, ma anche bambini e anziani. Il virus viene trasmesso da mammiferi infetti attraverso l'aria, da colpi di tosse e starnuti che creano particelle di aerosol contenenti il virus, e da volatili infetti attraverso escrementi. L'influenza può essere trasmessa anche attraverso saliva, secrezioni nasali, feci e sangue. Dopo un'incubazione di 1-4 giorni, l'influenza si manifesta in individui immunocompetenti con febbre, malessere, congestione nasale, sintomi del tratto respiratorio superiore che si risolvono in pochi giorni senza terapia specifica. Nei bambini, negli anziani o in persone immunodeficienti con malattie cardiopolmonari o croniche, il virus dell'influenza può causare polmonite, ipertensione, infiltrazioni interstiziali bilaterali. Ogni anno si verificano circa 36 mila morti e più di un milione di ospedalizzazioni a causa del virus dell'influenza. Il virus dell'influenza A, ma non il virus dell'influenza B, è responsabile di epidemie periodiche o pandemie con elevata mortalità (Wright & Webster, 2001). Più del 20% della popolazione

viene colpita dalle epidemie stagionali che si verificano ogni anno. Inoltre, ad intervalli irregolari, si sviluppano ceppi di influenza A antigenicamente nuovi in grado di infettare e trasmettersi efficientemente tra la popolazione generando ceppi pandemici che si trasmettono molto velocemente e che causano sintomi più gravi. La pandemia più devastante fu quella del 1918 scatenata dal ceppo H1N1 che infettò il 30% della popolazione causando circa 40 milioni di morti in tutto il mondo (Reid *et al.*, 2001). Altre pandemie, meno devastanti, furono quelle del 1957 (H2N2) e 1968 (H3N2). Un altro virus potenzialmente pandemico è il virus aviario H5N1. Questo virus fu trasmesso dai polli all'uomo nel 1997 ad Hong Kong uccidendo 6 su 18 persone infettate (Subbarao *et al.*, 1998). Il virus continuò a circolare in Cina, ma la trasmissione del virus dall'uomo non è stata documentata sino al 2003 (Peiris *et al.*, 2004). Il virus successivamente si diffuse dall'Asia in Europa e Africa. Esso comunque non ha ancora acquisito la capacità di trasmettersi da uomo a uomo. Di recente si è sviluppata una nuova pandemia causata dal virus H1N1, sebbene esso sia di virulenza relativamente bassa. Questo virus H1N1, derivato dal maiale è comparso per la prima volta in Messico e nel sud degli Stati Uniti nel marzo del 2009. Questo virus si è dimostrato essere letale solo nella popolazione a rischio (Wilson & Barker, 2009). Sono stati confermati circa 400 000 casi tra cui 5000 morti, ma potrebbe ricombinare diventando maggiormente virulento. Tutti i virus dell'influenza A hanno origine negli uccelli acquatici che generalmente sviluppano infezioni asintomatiche. A causa di questa origine, essi possono infettare gli umani direttamente o attraverso gli animali domestici usando come ospiti intermedi i maiali. L'infezione dell'uomo da virus aviari differisce dalle normali infezioni, in quanto questo virus non può essere trasmesso da uomo a uomo. E' comunque possibile che esso sia in grado di adattarsi e quindi anche di trasmettersi da uomo a uomo.

1.7 Prevenzione, profilassi e terapia

Le infezioni causate dal virus dell'influenza possono essere controllate mediante vaccinazione e farmaci antivirali. Il vaccino è il modo principale di ridurre l'impatto di una nuova pandemia influenzale (Monto, 2006); esso, tuttavia, previene l'infezione nel 70-90% degli adulti sani, ma solo nel 30-40% degli individui immunocompromessi. La formulazione del vaccino, inoltre, deve essere riformulata ogni anno a causa della capacità del virus di modificarsi. I composti contro il virus dell'influenza, che comprendono quelli attualmente disponibili in commercio come farmaci antivirali e quelli che sono ancora in fase di sviluppo, possono essere suddivisi in differenti classi a seconda del loro bersaglio: inibitori della neuraminidasi, inibitori del canale ionico M2, inibitori della IMP deidrogenasi, interferoni e siRNA, inibitori della RNA polimerasi e inibitori dell'emoagglutinina.

Quando l'emoagglutinina interagisce con l'acido N-acetilneuramico (NANA, acido sialico) della cellula ospite, la neuraminidasi taglia il NANA permettendo alla progenie virale di essere liberata dalla cellula infettata e di diffondersi ad altre cellule ospiti. Gli inibitori della neuraminidasi inibiscono il rilascio delle particelle virali inibendone lo *spread* (De Clercq, 2004; Moscona, 2005). Tra gli inibitori della neuraminidasi, il farmaco maggiormente utilizzato in terapia è l'oseltamivir (Tamiflu®) in quanto è di facile somministrazione (orale, 75 mg due volte al giorno per 5 giorni) e disponibile a livello sistemico. Nonostante la sua efficacia, questo farmaco provoca la comparsa di ceppi virali

ad esso resistenti. La resistenza all'oseltamivir in ceppi clinici è associata a mutazioni nella neuraminidasi del virus dell'influenza A in posizione 119 (E119V), 152 (R152K), 198 (D198N), 274 (H274Y) e 292 (R292K) (Kiso *et al.*, 2004). Nel caso in cui i ceppi virali siano altamente patogeni l'oseltamivir può essere somministrato per periodi più lunghi (8-10 giorni) e con dosi maggiori (150 mg). In alternativa può essere considerata come opzione terapeutica la somministrazione endovena dell'oseltamivir, in particolare in pazienti gravemente malati. Un altro inibitore della neuraminidasi attualmente disponibile in commercio è lo zanamivir (Relenza®). Questo farmaco deve essere somministrato per inalazione comportando una bassa disponibilità sistemica del farmaco (Shinya *et al.*, 2006) o in alternativa può essere somministrato endovena in caso di infezioni severe. Lo zanamivir è attivo contro ceppi oseltamivir-resistenti.

Altri inibitori della neuraminidasi, che sono però ancora in fase di sviluppo, sono il peramivir (RWJ270201; Sidwell *et al.*, 2001) e il composto A315675 (Katie *et al.*, 2002). Entrambi hanno mostrato attività contro ceppi di influenza A e B zanamivir- e oseltamivir-resistenti. Per quanto riguarda il peramivir, da studi clinici è emerso che una somministrazione orale non conferisce protezione contro il virus umano dell'influenza A. Studi con formulazioni parenterali sono attualmente in corso.

Gli inibitori del canale ionico M2 sono derivati degli adamantani: amantadina e rimantadina, che sono attivi in maniera specifica contro il virus dell'influenza A (non sono attivi contro il virus dell'influenza B). Essi interferiscono con il processo di scapsidazione del virus attraverso interazione diretta con la proteina di matrice M2 per cui M1 rimane associata a vRNP inibendone l'importo nucleare. Amantadina e rimantadina comunque sono noti per conferire velocemente resistenza (Hay *et al.*, 1986), il che compromette la loro potenziale attività nel trattamento delle infezioni virali.

Un inibitore della IMP deidrogenasi è la ribavirina (RBV), un agente antivirale ad ampio spettro (Sidwell *et al.*, 1972). La RBV è particolarmente attiva contro virus a RNA con polarità negativa compreso il virus dell'influenza di tipo A e di tipo B. Attualmente la RBV è stata approvata solo per la terapia delle infezioni del virus respiratorio sinciziale (RSV). Sebbene la ribavirina in forma orale non abbia avuto successo nel trattamento delle infezioni da virus dell'influenza A, essa è usata in combinazione con l'interferone α nel trattamento delle infezioni da virus dell'epatite C (HCV). Di recente la viramidina, un pro-farmaco analogo alla ribavirina, ha mostrato simile efficacia contro infezioni da virus dell'influenza, ma con minore tossicità (Sidwell *et al.*, 2005). Questo farmaco è in trial clinico di Fase III contro le infezioni da HCV.

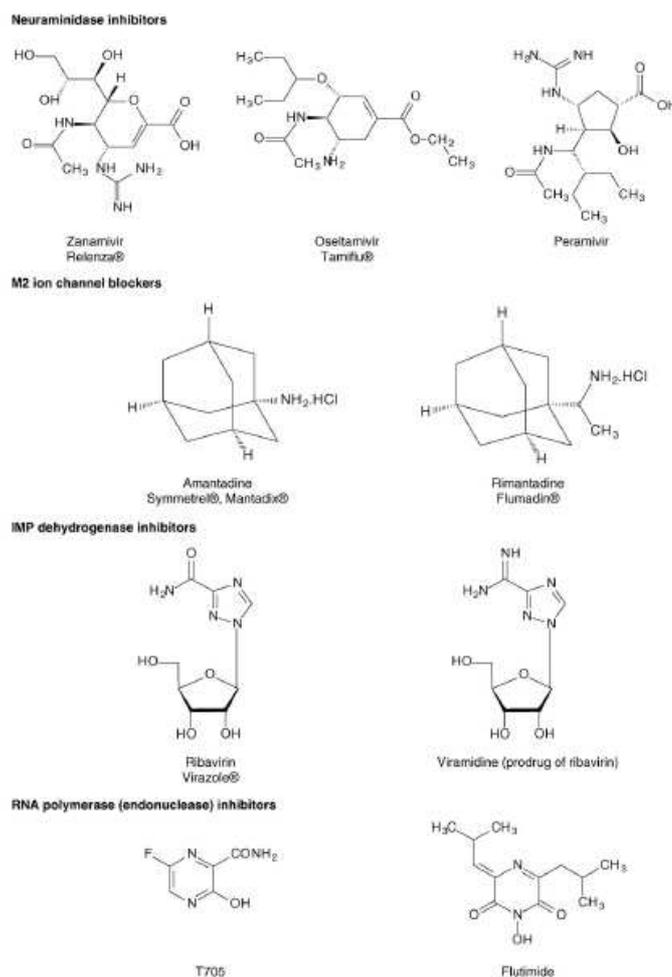


Figura 14. Inibitori del virus dell'influenza.

Un'altra classe di inibitori sono gli *small interfering RNA* (siRNA) in grado di silenziare in maniera specifica un gene bersaglio senza avere un impatto sull'espressione dei geni dell'ospite. In particolare gli siRNA (21-26 nt) possono indurre un processo catalitico inibendo le molecole di mRNA e causare una diminuzione dell'espressione del gene bersaglio. Gli siRNAs hanno attività antivirale e potrebbero potenzialmente diventare una nuova classe di farmaci anti-influenza. Alcuni studi hanno dimostrato che siRNAs o oligonucleotidi antisense possono effettivamente inibire la replicazione del virus dell'influenza (Ge *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008). L'utilizzo di questi siRNA è stato applicato anche contro la polimerasi del virus dell'influenza ed in particolare sono stati disegnati siRNAs sulla regione N-terminale altamente conservata di PA. È stato dimostrato come anche questi siRNAs inibiscono la replicazione virale sia *in vitro* che *in vivo* (Zhang *et al.*, 2009). Sistemi di *delivery* compatibili con un utilizzo nell'uomo, inoltre, hanno dimostrato un potenziale uso degli siRNAs nella profilassi e terapia delle infezioni del virus dell'influenza (Ge *et al.*, 2004).

Un composto diretto contro la polimerasi virale è il T705: una pirazina sostituita (6-fluoro-3-idrossi-2-pirazinacarbossamide; Furuta *et al.*, 2002). Questa pirazina viene monofosforilata da fosforibosil transferasi virali, successivamente riconosciuta da enzimi cellulari come una nucleo base e convertita a ribofuranosil-5'-trifosfato che inibisce l'attività della polimerasi virale (Furuta *et al.*, 2005). È stato dimostrato che questo composto ha attività contro influenza A, B e C (Furuta *et al.*, 2002; Furuta *et al.*, 2005),

ceppi virali resistenti ai farmaci comunemente utilizzati in terapia (Sleeman *et al.*, 2010) e il ceppo aviario H5N1 (Kiso *et al.*, 2010). Questo composto è in trial clinico di Fase I.

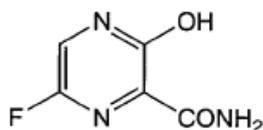


Figura 15. Struttura del composto T-705.

Altri composti anti-influenza che inibiscono l'RNA polimerasi virale sono rappresentati dalla nucleozina e da suoi analoghi identificati mediante un *high-throughput screening*. Questi composti hanno come bersaglio l'RNA polimerasi RNA dipendente in particolare agiscono a livello della nucleoproteina (composto 788) e della proteina PB1 con un meccanismo ancora non noto (composto 367; **Figura 16**; Su *et al.*, 2010).

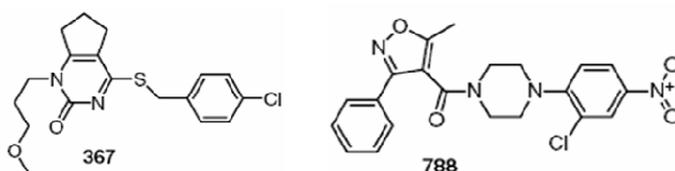


Figura 16. Struttura dei composti 367 e 788.

Un altro possibile bersaglio è l'attività endonucleasica cap-dipendente del complesso della polimerasi. Un inibitore di endonucleasi, la flutimide, ha attività inibitoria contro la replicazione del virus dell'influenza A e B, ma non è stata sviluppata ulteriormente (Tommasini *et al.*, 2005).

Un'altra classe di composti anti-influenza è costituita dagli inibitori dell'HA. Il cambiamento conformazionale di questa glicoproteina induce la fusione dell'*envelope* con la membrana endosomiale. Inibitori di questo cambiamento conformazionale inibiscono quindi la replicazione virale (Bodian *et al.*, 1993). Un inibitore di questo tipo è il tert-butyl idrochinone (TBHQ). Questo composto stabilizza la conformazione dell'HA a pH neutro legandosi in una tasca idrofobica dell'HA.

Di recente sono stati identificati nuovi composti, come il tiadiazolo [α 2, 3] pirimidina e la pirimidinil aciltiourea, che inibiscono la replicazione virale a basse concentrazioni (Sun *et al.*, 2006). Il meccanismo d'azione e il bersaglio di questi composti non è stato ancora identificato.

1.8 Inibitori dell'interazione tra le subunità di DNA polimerasi

Gli agenti antivirali attualmente utilizzati per il trattamento delle infezioni da virus dell'influenza (adamantani, oseltamivir e zanamivir) hanno diversi vantaggi.

Amantadina e rimantadina agiscono solo sulle infezioni provocate dal virus di tipo A. Inoltre, andrebbero usati solo in caso di gravi complicazioni in quanto possono avere effetti collaterali gravi di tipo neurologico e favorire lo sviluppo di ceppi virali resistenti. L'amantadina e la rimantadina possono essere utilizzate anche a scopo preventivo nelle

persone ad alto rischio per complicanze dovute all'influenza e che non si sono potute vaccinare (o in cui si suppone non si sia sviluppata una buona risposta immunitaria al virus influenzale). L'amantadina è comunque sconsigliata per i bambini sotto l'anno di età.

Oseltamivir e zanamivir, invece, sono attivi sia contro il virus dell'influenza di tipo A che di tipo B, ma vanno assunte entro le 48 ore dall'insorgenza dei sintomi.

Questi farmaci non possono essere somministrati ai bambini al di sotto dei 12 anni d'età e alle donne in gravidanza o durante l'allattamento perché non vi sono ancora dati sufficienti per assicurarne l'innocuità in questi casi. Inoltre entrambi causano effetti collaterali al sistema nervoso centrale e gastrointestinale. Anche per questi farmaci come per gli adamantani è stata registrata la comparsa di molti ceppi virali resistenti.

Questi problemi stimolano la ricerca di nuovi composti che siano più attivi, più specifici e meno tossici. Una nuova strategia per inibire la replicazione virale, proposta dal nostro gruppo di ricerca (Loregian *et al.*, 2002; Loregian & Palù, 2005a; Loregian & Palù, 2005b), si basa sulla dissociazione di complessi proteici virali attraverso l'uso di peptidi o composti peptidomimetici che mimano una delle regioni coinvolte nell'interazione tra le subunità del complesso proteico. L'assoluta specificità delle interazioni proteina-proteina offre la possibilità di attuare una inibizione selettiva e virus-specifica. Questi composti potrebbero, inoltre, ovviare al problema dei ceppi resistenti. Mutazioni puntiformi nel sito catalitico dell'enzima spesso conferiscono resistenza a farmaci che sono analoghi dei substrati naturali, invece, una singola mutazione in una subunità dell'interfaccia proteina-proteina richiede la mutazione complementare nell'altra subunità per mantenere intatto il complesso ed è molto più difficile che insorgano due mutazioni complementari. Questo rende improbabile il fatto che la proteina bersaglio acquisisca resistenza all'inibitore. Infine, poiché questi composti hanno come bersaglio siti differenti rispetto ai farmaci antivirali comunemente utilizzati, verosimilmente essi potrebbero essere attivi anche contro ceppi virali resistenti a questi farmaci.

Il primo esempio riportato in letteratura della dissociazione di un complesso proteico virale è quello della ribonucleotido reduttasi (RR) di HSV-1. La RR di HSV-1 è un tetramero costituito da due subunità maggiori (R1) e due minori (R2) (Dutia *et al.*, 1983). Nel 1986 due differenti gruppi di ricerca riportarono che il nonapeptide sintetico YAGAVVNDL, corrispondente alla regione C-terminale della subunità minore R2, inibiva in modo specifico l'attività della RR di HSV-1 impedendo la formazione dell'oloenzima attivo (Cohen *et al.*, 1986; Dutia *et al.*, 1986). Tuttavia, studi successivi riportarono che il peptide non era in grado di inibire la replicazione virale in cellule infettate con HSV-1 a causa della sua incapacità di penetrare nelle cellule. Per ovviare a questo problema, dal nostro gruppo di ricerca il peptide è stato fuso ad una proteina *carrier*, la subunità B dell'enterotossina termolabile di *E. coli*, in grado di penetrare nelle cellule infettate. Si è osservato che la proteina di fusione inibiva l'attività della RR e la replicazione virale in cellule infettate da HSV-1 (Marcello *et al.*, 1994). La scoperta di questo peptide in grado di inibire una interazione proteina-proteina e quindi la replicazione virale ha dato il via allo sviluppo di questa nuova strategia antivirale. Un altro esempio è la DNA polimerasi del citomegalovirus umano (HCMV). Questa polimerasi è costituita da due subunità: una subunità catalitica UL54 e una subunità accessoria UL44. Studi precedenti condotti dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che pochi residui sono cruciali per il legame tra UL54 e UL44; infatti singole sostituzioni in una delle due subunità sono in grado di inibire completamente l'interazione (Loregian *et al.*, 2004a; Loregian *et al.*, 2004b). Queste osservazioni hanno quindi suggerito che anche piccole molecole potessero essere in grado di dissociare l'interazione tra le due subunità della DNA polimerasi di HCMV e quindi inibire la replicazione virale.

Successivamente, attraverso uno *screening* di circa 50.000 “*small molecules*” sono state identificate delle molecole che inibiscono l’interazione tra le due subunità UL44 e UL54 (Loregian & Coen, 2006). In particolare sono stati identificati 5 composti con diversa struttura (AL5, AL9, AL12, AL18 e AL21) capaci di: (1) interferire *in vitro* con l’interazione fisica tra le proteine UL54 e UL44; (2) inibire l’attività enzimatica *in vitro* della DNA polimerasi di HCMV in maniera dose-dipendente, con valori di IC₅₀ compresi tra 5 e 15 µM; (3) inibire in modo specifico la replicazione di HCMV in colture cellulari infettate con EC₅₀ comprese tra 0,4 e 3,5 µM; (4) esibire attività citotossica a concentrazioni tra le 11 e le 500 volte più alte rispetto alla concentrazione in grado di inibire la replicazione virale (Loregian & Coen, 2006).

Un altro potenziale bersaglio per questo tipo di strategia è la RNA polimerasi del virus dell’influenza. Infatti, come detto precedentemente, la RNA polimerasi del virus dell’influenza è un complesso multiproteico costituito da tre subunità tutte necessarie affinché avvenga la replicazione virale. E’ stato dimostrato che un peptide che dissocia l’interazione tra le subunità PB1 e PA dell’RNA polimerasi del virus dell’influenza inibisce anche la replicazione virale (Ghanem *et al.*, 2007; Wunderlich *et al.*, 2009). Inoltre è stata di recente pubblicata da due diversi gruppi di ricerca la struttura cristallografica della porzione C-terminale di PA complessata con la porzione N-terminale di PB1 (Obayashi *et al.*, 2008; He *et al.*, 2008). Dalla struttura cristallografica del complesso proteico è emerso che solo pochi residui regolano il legame tra PB1 e PA. Per entrambi questi motivi si può prevedere che sia possibile identificare composti che mimano l’interfaccia di interazione tra le subunità prevenendone il legame e l’attività polimerasica, e quindi anche la replicazione virale.

2. Scopo

Scopo di questo progetto di dottorato è quello di identificare delle *small molecules* dirette contro la polimerasi del virus dell'influenza.

Questo studio si basa sul fatto che l'RNA polimerasi del virus dell'influenza è un eterotrimerico costituito da tre proteine (PB1, PB2 e PA) indispensabili per la replicazione del genoma virale. Le regioni di interazione tra queste subunità sono altamente conservate tra i diversi ceppi virali e non soggette a riassortimento genico. Per questo motivo, l'inibizione di queste interazioni potrebbe rappresentare una potenziale strategia per lo sviluppo di composti anti-influenza ad ampio spettro, ovviando al problema della variabilità antigenica e ottenendo un farmaco attivo contro qualsiasi ceppo del virus dell'influenza. Inoltre grazie alla struttura cristallografica di PA complessata con la porzione N-terminale di PB1 è stato possibile dimostrare che solo alcuni residui sono responsabili del legame tra PB1 e PA, il che suggerisce la possibilità di inibire questa interazione anche con piccole molecole. E' nostra intenzione, quindi, quale nuova strategia antivirale per combattere le infezioni del virus influenzale, sviluppare composti in grado di dissociare l'interazione tra le subunità PA e PB1 dell'RNA polimerasi virale e di conseguenza di inibire la replicazione del virus; tali composti potrebbero rappresentare un punto di partenza per lo sviluppo di nuovi farmaci anti-influenza. Intendiamo identificare questi composti tramite uno *screening in silico* di librerie virtuali sulla base della struttura cristallografica del complesso PA-PB1. Lo *screening* virtuale consisterà nell'analisi di librerie contenenti milioni di molecole diverse. Partendo da questi *database* di strutture di molecole saremo in grado di selezionare un numero ristretto di composti con cui procedere nei successivi saggi biologici.

In particolare, una volta che avremo selezionato mediante *screening in silico* un certo numero di composti potenzialmente attivi, questi verranno sottoposti a saggi mirati a confermare la loro capacità di dissociare sia *in vitro* che in un contesto cellulare l'interazione fisica tra le subunità della polimerasi del virus dell'influenza. Partendo dai composti attivi, procederemo poi con l'ottimizzazione della loro struttura chimica. Sarà disegnata e sintetizzata un'ampia serie di analoghi strutturali con lo scopo di aumentare la potenza e la selettività dei composti attivi e di delineare le relazioni struttura-attività. Successivamente verrà valutata la capacità dei composti che mostreranno maggiore attività antivirale di inibire la replicazione virale (mediante saggio delle placche contro diversi virus di influenza A e di influenza B), la traslocazione nel nucleo del complesso PA/PB1 e l'espressione delle proteine virali. Dal momento che il bersaglio è conservato tra i diversi sottotipi di influenza, ci attendiamo che questi composti saranno attivi contro molti ceppi del virus e per questo motivo potrebbero rappresentare una base di partenza per lo sviluppo di nuovi farmaci anti-influenzali ad ampio spettro.

Inoltre, intendiamo saggiare alcuni Stealth siRNAs disegnati contro il trascritto di PB1 per valutare la loro capacità di inibire anche l'attività polimerasica mediante *minireplicon assay*. E' stato, infatti, dimostrato dal gruppo della Dott.ssa Livia Di Trani che, almeno uno di questi, è in grado di inibire la replicazione virale in cellule infettate.

3. Materiali e Metodi

3.1 Composti

I composti sono stati acquistati dalla Cambridge corporation o sintetizzati presso il laboratorio del Prof. G. Cruciani (Università di Perugia), solubilizzati in DMSO (dimetilsolfossido, Sigma-Aldrich) e conservati a -20°C. Gli Stealth siRNA sono stati acquistati dalla Invitrogen, solubilizzati in H₂O e conservati a -20°C.

Come composti di riferimento è stata utilizzata RBV (Roche), solubilizzata in H₂O e conservata a -20°C e GCV (Sigma), solubilizzato in DMSO e conservato a -20°C.

3.2 Proteine

La proteina GST è stata espressa dal plasmide pD15-GST e purificata da colture di *E. coli* BL21(DE3)/pLysS mediante cromatografia di affinità con colonne di “sepharose” coniugato a glutatione (Loregian *et al.*, 2004a).

3.3 Oligonucleotidi sintetici

Gli oligonucleotidi sintetici usati in questo lavoro di tesi sono riportati in **Tabella 3**.

Tabella 3. Sequenza degli oligonucleotidi utilizzati.

Primer	Lunghezza	Sequenza nucleotidica
pD15-PB1 1-25/F,	30-mer	5' - AAAAACTCGAGATGGATGTCAATCCGACC -3'
pD15-PB1 1-25/R	31-mer	5' - TAAAAACGCGTCTAGGTATAAGGGAAAAGTC - 3'
pD15seq/FOR	18-mer	5' - TTCGCTACTTGGAGCCAC -3'
pD15seq/REV	18-mer	5' - ATGCGTTCCTCCAAAATTAG -3'
pET28aPA239716/F	30-mer	5' - TTTTATGAATTCAACGGCTACATTGAGGGC -3'
pET28aPA239716/R	31-mer	5' - TAAAGCGCCCGCCTAACTCAATGCATGTGT -3'
T7/F	18-mer	5' - AATACGACTCACTATAGG -3'
T7/R	21-mer	5' - CTAGTTATTGCTCAGCGGTGG -3'
pcDNA-PB1/F	30-mer	5' - AAATAAAAGCTTATGGATGTCAATCCGACC -3'
pcDNA-PB1/R	30-mer	5' - AATAATAGATCTTTTTTGCCGTCTGAGCTC -3'
pcDNAPA/F	31-mer	5' - TTTTATGAATTCATGGAAGATTTTGTGCGAC -3'
pcDNAPA/R	32-mer	5' - TATTATAGATCTATTGATGGCCATCCGAATTC -3'
pcDNAPB2/F	31-mer	5' - AAAAAAGGATCCATGGAAAGAATAAAAGAAC -3'

pcDNAPB2/R	32-mer	5'- TATTATAGATCTATTGATGGCCATCCGAATTC -3'
pcDNABgIIIPB2mut/F	39-mer	5'- GACATAAAATCCTGGTCATGCGGATCTCAGTGCCAAGGAG-3'
pcDNABgIIIPB2mut/R	39-mer	5'- CTCCTTGGCACTGAGATCCGCATGACCAGGATTTATGTC -3'
pcDNA3/F1	19-mer	5'-ATT GAA GCA TTT ATC AGG G-3'
pcDNA3/R1	18-mer	5'-GAC AGT GGG AGT GCG ACC-3'

3.4 Plasmidi

3.4.a Plasmide pcDNA3

Il plasmide pcDNA3 (Invitrogen) è un vettore di espressione di 5.4 kbp. Il vettore contiene: (1) il promotore/enhancer IE di HCMV che permette un livello di espressione alto ed efficiente della proteina ricombinante di interesse il cui gene viene clonato a valle; (2) il promotore T7; (3) un sito di policlone per permettere l'inserzione del gene o della sequenza di DNA di interesse; (4) il sito di poliadenilazione del gene BGH (*Bovine Growth Hormone*) per avere una terminazione efficiente della trascrizione e la poliadenilazione dell'mRNA; (5) il gene per la resistenza all'ampicillina per selezionare il vettore in *E. coli* e il gene di resistenza alla neomicina per la selezione in cellule di mammifero; (6) l'origine di replicazione ColE1 che permette la replicazione del plasmide con un alto numero di copie in *E. coli* (**Figura 17**).

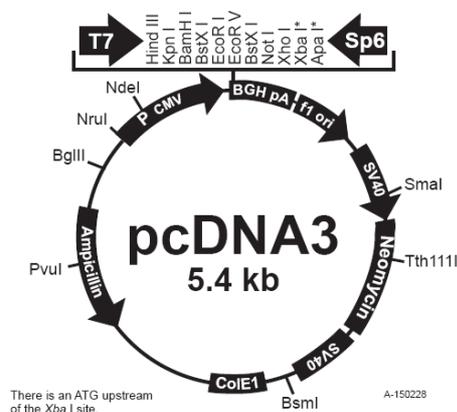


Figura 17. Mappa del plasmide pcDNA3.

I plasmidi pcDNA3-PA, pcDNA3-PB1, pcDNA3-PB2 e pcDNA3-NP sono stati forniti dal Prof. Paul Digard (University of Cambridge, UK) e contengono rispettivamente i geni *PA* (2200 bp) nel sito EcoRI, *PB1* (2300 bp) nel sito HindIII, *PB2* (2300 bp) nel sito BamHI o *NP* (1500 bp) nel sito EcoRI di pcDNA3. Il plasmide pPolI-Luc fornito da P. Digard contiene le sequenze non codificanti del segmento 8 del genoma del virus dell'influenza all'interno delle quali è stato inserito il gene della luciferasi.

Il plasmide pcDNA-GFP-PA è stato fornito da P. Digard e contiene il gene *PA* (2200 bp) fuso alla GFP.

I plasmidi pcDNA-gD-EGFP (158-239) e pcDNA-N1-EGFP (1-157) forniti dalla Prof.ssa G. Campadelli-Fiume (Università di Bologna) contengono rispettivamente il gene *gD* fuso alla EGFP frammento 158-239 e il gene *N1* fuso alla EGFP frammento 1-157.

3.4.b Plasmide pRSET

Il plasmide pRSET (2,9 kb, Invitrogen, **Figura 18**) è un vettore di espressione in *E. coli* che contiene il promotore per l'RNA polimerasi del fago T7 (basi 20-39), il *ribosome binding site* (RBS), un *tag* di poli-istidine N-terminali (6xHis, basi 112-129) per una rapida purificazione di proteine di fusione ricombinanti in batteri con resine a base di nickel, un sito di policloneaggio (basi 202-248), il T7 *reverse priming site* e il terminatore per la RNA polimerasi del fago T7. Contiene inoltre l'origine di replicazione pUC ori per *E. coli* ed il gene codificante la resistenza all'ampicillina per il mantenimento in ceppi batterici.

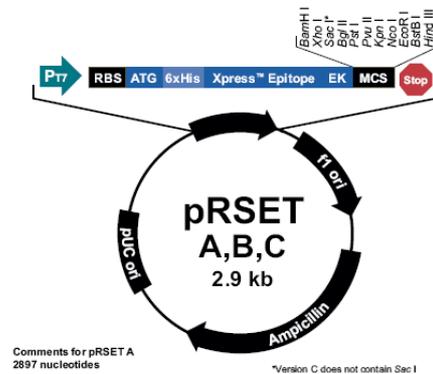


Figura 18. Mappa del plasmide pRSET.

3.4.c Plasmide pD15-GST

Il plasmide pD15-GST (5,4 kb, fornito dal Prof. Donald M. Coen, Harvard Medical School, Boston, MA) è un vettore di espressione in *E. coli* che contiene il promotore per l'RNA polimerasi del fago T7, il *ribosome binding site* (RBS), un *tag* GST per purificare proteine di fusione ricombinanti in batteri. Contiene inoltre il gene codificante la resistenza all'ampicillina per il mantenimento in ceppi batterici

3.4.d Plasmide pET28a

Il plasmide pET28a (5,4 kb; Novagen, **Figura 19**) è un vettore di espressione in *E. coli* che contiene il promotore per l'RNA polimerasi del fago T7, un *tag* di poli-istidine per una rapida purificazione di proteine di fusione ricombinanti in batteri con resine a base di nickel, un sito di policloneaggio e il terminatore per la RNA polimerasi del fago T7. Inoltre contiene il gene codificante la resistenza alla kanamicina per il mantenimento in ceppi batterici.

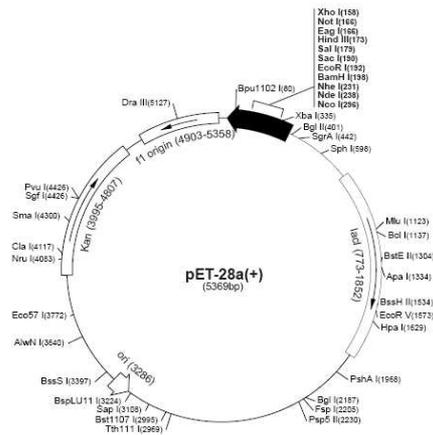


Figura 19. Mappa del plasmide pET28a.

3.4.e Plasmidi per il saggio di minireplicon con il virus dell'influenza B

I plasmidi pCIP-PA, pCIP-PB1, pCIP-PB2 e pCIP-NP sono stati forniti da P. Digard (University of Cambridge, UK) e contengono rispettivamente i geni *PA*, *PB1*, *PB2* o *NP* del virus dell'influenza B. Il plasmide pPolI-GFP-HA è stato fornito da P. Digard e contiene le sequenze non codificanti del segmento 8 del genoma del virus dell'influenza B all'interno delle quali è stato inserito il gene della GFP.

3.5 Cellule e Virus

Cellule HEK 293T (*Human Embryonic Kidney 293T*), MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*), A549 (*carcinomic human alveolar basal epithelial cell*), L929 (fibroblasti murini), cellule Vero (cellule di rene di scimmia, *African green monkey kidney cells*) sono state coltivate nel terreno di Eagle modificato secondo Dulbecco (DMEM; Gibco® Life Technologies) supplementato con siero fetale bovino (*Foetal Bovine Serum*, FBS; Gibco® Life Technologies) 10% precedentemente inattivato (per 30' a 56°C), penicillina e streptomycin 1% finale (P/S, Gibco® Life Technologies). La linea cellulare umana T-lymfoblastoides HSB-2 è stata coltivata in terreno RPMI-1640 (Gibco® Life Technologies) supplementato con FBS 10% e P/S. Tutte le colture cellulari sono state mantenute alla temperatura costante di 37°C in presenza del 5% di CO₂.

Il virus dell'influenza A/PR/8/34 è stato fornito dal Prof. Paul Digard (University of Cambridge, UK). Il virus dell'influenza B/malaysia/2506/4 è stato fornito dal dott. Cusinato (Servizio di Microbiologia, Azienda Ospedaliera di Padova). I virus dell'influenza A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06 e A/PARMA/24/09 sono stati forniti dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS, Roma).

Il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1, ceppo F) è stato fornito dal Prof. Donald M. Coen (Harvard Medical School, Boston, MA); il vesicular stomatitis virus (VSV) è stato fornito dal Prof. G. Gribaudo (Università di Torino).

3.6 Ceppo batterico e terreni di coltura

Ceppi di <i>Escherichia coli</i>	
Ceppo	Genotipo
DH5 α	F ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻
BL21(DE3) pLys	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal λ (DE3)[pLysS Cam ^r]

Il ceppo batterico utilizzato nel nostro studio è *E. coli* DH5 α . Questo ceppo batterico è stato coltivato in terreno liquido LB (Luria-Bertani) contenente bacto-triptone 1%, estratto di lievito 0,5%, NaCl 1% oppure su terreno solido LB addizionato con bacto-agar 1,5% (LB-agar). A questi terreni è stato aggiunto l'antibiotico ampicillina (100 μ g/ml) per il mantenimento dei plasmidi.

Un terreno più ricco, il SOC, è stato utilizzato durante la trasformazione batterica per elettroporazione (bacto-triptone 2%, estratto di lievito 0,5%, NaCl 0,5%, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosio 20 mM).

3.7 Trasformazione batterica mediante elettroporazione

3.7.a Preparazione di batteri elettrocompetenti

Una singola colonia di *E. coli* DH5 α è stata inoculata in 4 ml di LB e fatta crescere O/N a 37°C. In seguito, i 4 ml di coltura sono stati inoculati in 400 ml di LB, e i batteri sono stati fatti crescere per circa 3 ore fino al raggiungimento di un OD₆₀₀ pari a circa 0,5. In seguito è stata bloccata la crescita incubando le cellule in ghiaccio per 20-25 minuti. Le cellule sono state poi centrifugate a 4000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il *pellet* cellulare è stato risospeso in 80 ml di acqua sterile fredda e ricentrifugato; successivamente è stato risospeso in 160 ml di glicerolo 10%, ricentrifugato e risospeso infine in 12 ml di GYT (glicerolo 10%, Yeast Extract 0,125%, bacto-triptone 0,25%). I batteri sono stati aliquotati (aliquote da 100 μ l) e conservati a -80°C.

3.7.b Trasformazione mediante elettroporazione

Una volta scongelate in ghiaccio le aliquote di *E. coli* DH5 α , sono stati aggiunti circa 100-200 ng del plasmide con cui si intendeva effettuare la trasformazione e i batteri sono stati trasferiti in apposite cuvette per elettroporazione (BioRad) pre-raffreddate in ghiaccio. L'apparecchio Gene Pulser (BioRad) è stato programmato a 1,5 KV, 1000 Ω , 25 μ F e i batteri sottoposti ad uno *shock* elettrico. In seguito allo *shock* sono stati aggiunti 900 μ l di SOC e i batteri sono stati incubati in agitazione a 225 rpm a 37°C per 30 minuti. Successivamente i batteri sono stati piastrati su terreno selettivo LB-agar e fatti crescere a 37°C O/N.

3.8 Tecniche di biologia molecolare

Sono riportate di seguito le tecniche di biologia molecolare che sono state utilizzate durante questo lavoro di tesi.

3.8.a Estrazione e purificazione di DNA plasmidico da *E. coli*

Per isolare il DNA plasmidico dalle cellule batteriche sono state effettuate preparazioni in grande scala (Maxiprep) da batteri in coltura (circa 0,5-1 l) da cui il DNA plasmidico è stato estratto seguendo il protocollo della lisi alcalina e successivamente purificato mediante precipitazione con polietilenglicole (PEG) (Sambrook *et al.*, 1989a). Secondo questa procedura, una volta lisate le cellule, è stato utilizzato cloruro di litio (LiCl_2) 2,5 M per precipitare selettivamente le molecole di RNA ad elevato peso molecolare; poi l'enzima RNasi per degradare l'RNA rimasto e infine il PEG 8000 per far precipitare selettivamente il DNA plasmidico.

Il DNA plasmidico ottenuto è stato risospeso in TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e, al fine di stabilirne purezza e concentrazione, una piccola aliquota è stata diluita in acqua e ne è stata letta la densità ottica (OD) a 260 e 280 nm in cuvette da 0,1 cm (Eppendorf). Il DNA è stato considerato sufficientemente puro quando il rapporto $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ era maggiore di 1,8. La misura della concentrazione di DNA si è basata sul fatto che ad una unità di densità ottica a 260 nm corrispondono 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di DNA a doppia elica. La concentrazione in $\mu\text{g}/\text{ml}$ è stata quindi calcolata con la seguente formula:

$$\text{OD}_{260} \times 50 \times 10 \times \text{fattore di diluizione}$$

In alternativa in alcuni casi sono state fatte preparazioni di DNA plasmidico in piccola scala dette "miniprep" (Sambrook *et al.*, 1989b). Tale purificazione è stata ottenuta partendo da 1-2 ml di coltura batterica con un protocollo simile a quello sopra descritto, anche se molto semplificato.

3.8.b Taglio di DNA con enzimi di restrizione

Le diverse reazioni di restrizione di DNA plasmidico sono state eseguite con enzimi NE BioLabs nei rispettivi tamponi di reazione. Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dell'enzima (37°C) per 2-6 ore.

3.8.c PCR ("polymerase chain reaction", reazione a catena della polimerasi)

La reazione di PCR per il clonaggio è stata effettuata utilizzando 100 ng del plasmide contenente l'inserto da amplificare in un volume di 100 μl comprendente gli opportuni *primers forward* e *reverse* (vedi **Tabella 3**) alla concentrazione 0,2-0,3 μM , dATP, dTTP, dCTP e dGTP 200 μM , MgCl_2 1,5 mM, 1,25 unità di Taq polimerasi (Taq Gold DNA polymerase, Perkin Elmer) in Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM. La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando un *thermocycler* (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) secondo il seguente schema: denaturazione del DNA e attivazione della Taq Gold (10 min a 95°C), 30 cicli comprendenti ciascuno una reazione di denaturazione (1

min a 94°C), appaiamento (1 min a 45°C) ed estensione (1 min a 72°C). Al termine la reazione è stata protratta per 10 min a 72°C e poi bloccata a 4°C.

3.8.d Separazione dei frammenti di DNA con gel d'agarosio

I plasmidi e i frammenti di DNA amplificati con PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel d'agarosio 1-1,5% (SeaKem) in tampone TAE [Tris-Acetato-EDTA 1x, ossia Tris-acetato 0,04 M e EDTA 0,001M (Carlo Erba)] e visualizzati con un transilluminatore a raggi UV dopo colorazione del gel con bromuro d'etidio (Sigma-Aldrich) 0,5 µg/ml.

Per verificare le dimensioni dei plasmidi o dei frammenti di DNA è stato utilizzato il marcatore 1 Kilobase DNA Ladder (NE BioLabs; 500-10000 bp).

3.8.e Purificazione di DNA plasmidico da gel

Dopo la separazione dei frammenti di DNA in gel di agarosio, la banda di interesse è stata tagliata, incubata per 20 minuti a -80°C e frantumata. Il DNA è stato estratto utilizzando un ugual volume di fenolo/cloroformio e successivamente precipitato utilizzando 0,1 volumi di NaAc 3 M pH 5,2 e 2 volumi di etanolo 100%. In seguito sono stati eseguiti dei lavaggi con etanolo 70% .

3.8.f Ligazione di frammenti di DNA

Le reazioni di ligazione sono state effettuate utilizzando la DNA ligasi del batteriofago T4 (BioLabs) per 16 h a 14°C in un volume finale di 10 µl; sono state usate 0,2 unità di enzima e un rapporto vettore:inserto 1:8. I prodotti di ligazione sono stati in seguito precipitati come sopra, lavati con etanolo 70% per rimuovere i sali ed infine risospesi in H₂O bidistillata ed utilizzati per la trasformazione di cellule batteriche.

3.8.g Sequenziamento

Il sequenziamento di DNA plasmidico è stato effettuato utilizzando l'ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer), che si basa sul metodo enzimatico di Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Tale metodo utilizza dideossinucleotidi terminatori (ddNTPs) a cui è legato un gruppo donatore di fluorescenza (fluoresceina) collegato, tramite un *linker*, ad un gruppo accettore di fluorescenza (d-rodamina). Il *linker* assicura la massima efficienza di trasferimento di energia tra il gruppo donatore ed accettore di fluorescenza. Questi due gruppi sono associati ai ddNTPs in modo da non interferire stericamente con la reazione di incorporazione dei ddNTPs nel filamento neosintetizzato. Ognuno dei quattro ddNTPs lega un diverso gruppo accettore, che è eccitato dalla stessa lunghezza d'onda (448 nm), ma emette il massimo di fluorescenza in un diverso intervallo di lunghezza d'onda, variabile tra 500 e 700 nm (dR110 per la guanina, nel blu; dR6G per l'adenina, nel verde; dTAMRA per la timina, nel giallo; dROX per la citosina, nel rosso).

I plasmidi da sequenziare sono stati precedentemente amplificati tramite PCR. Nella miscela di reazione sono stati mescolati 1 µl di BigDye™ Terminator Mix (Applied

Biosystem); 2 µl di tampone 5x (Tris-HCl 200 mM pH 9,0, MgCl₂ 5 mM) e 700 ng di plasmide da sequenziare, in un volume finale di 20 µl. La reazione è stata condotta utilizzando un termociclatore (Thermal Cycler, Eppendorf) secondo il seguente schema:

- 95°C per 10 min

e 30 cicli comprendenti ciascuno una reazione di:

- denaturazione per 30 sec a 95°C

- appaiamento per 5 sec a 50-55°C

- estensione per 4 min a 60°C

Al termine la reazione è stata bloccata a 4°C.

In seguito alla reazione di amplificazione il DNA è stato purificato dai nucleotidi non incorporati. Ai prodotti di PCR sono stati aggiunti 16 µl di H₂O deionizzata e 64 µl di etanolo 96% e sono stati incubati per 30 min a temperatura ambiente. Successivamente la miscela è stata centrifugata per 30 min, è stato eliminato il surnatante e il DNA precipitato lavato con 100 µl di etanolo 70%. Infine il DNA da sequenziare è stato risospeso in 17 µl di tampone contenente anche formamide e incubato a 95°C per 4 min e poi messo in ghiaccio. Dopo essere stati sottoposti a tale trattamento, i frammenti amplificati sono stati sequenziali utilizzando lo strumento 3130X/Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.8.h Mutagenesi sito-diretta

La mutagenesi sito-diretta è stata effettuata con il QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). La mutagenesi è stata effettuata seguendo le indicazioni riportate dal manuale del kit. In **Tabella 3** sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi usati per la mutagenesi.

3.9 Espressione e purificazione di proteine di fusione

3.9.a Espressione e purificazione della proteina di fusione 6His-PA (239-716)

Per purificare la proteina di fusione 6His-PA (239-716), un'aliquota di *E. coli* BL21(DE3)pLys è stata elettroporata con 500 ng del plasmide pRSETA-PA (239-716). Dopo aver fatto crescere la coltura *overnight* (O/N) a 37°C in 20 ml di LB con kanamicina 50 µg/ml, questa è stata diluita 1:50 in LB con kanamicina 50 µg/ml e fatta crescere a 37°C fino al raggiungimento di una OD₆₀₀ pari a 0,8-1. Quando la coltura ha raggiunto OD₆₀₀ 0,8-1 ne è stato prelevato 1 ml, centrifugato a 13000 rpm ed il *pellet* è stato risospeso in 100 µl di *sample buffer* 1X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerolo 10%, sodio dodecilsolfato (SDS) 2%, β-mercaptoetanol 5%, blu di bromofenolo 0,5%) e fatto bollire 5 minuti (campione pre-induzione). L'espressione proteica è stata indotta con IPTG 0,5 mM incubando a 16°C O/N. Al termine dell'induzione è stato prelevato 1 ml di coltura, centrifugato, risospeso in 100 µl di *sample buffer* 1X e fatto bollire 5 minuti (campione post-induzione). La coltura è stata centrifugata a 13000 rpm ed il *pellet* è stato risospeso in tampone di lisi (Tris HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, urea 500 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, imidazolo 25 mM, lisozima 1 mg/ml e inibitori di proteasi). La miscela è stata sottoposta a 2 cicli di congelamento/scongelo e a sonicazione (5 volte per 30"). Successivamente il lisato batterico è stato centrifugato per 30 minuti a 13000 rpm a 4°C.

Dal surnatante sono stati prelevati 100 μ l, sono stati aggiunti 25 μ l di *sample buffer* 5X; il campione è stato fatto bollire 5 minuti (campione surnatante). In parallelo è stata preparata la colonna con la resina NI-NTA agarose funzionalizzata con nichel (Qiagen) ed equilibrata con 10 volumi di tampone di lisi. Il surnatante è stato caricato in colonna ed è stato raccolto lo scarto. Si sono prelevati 100 μ l dello scarto, si sono aggiunti, 25 μ l di *sample buffer* 5X e risono fatti bollire 5 minuti (campione scarto). La colonna è stata lavata con 10-20 volumi di tampone di lavaggio (Tris HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, urea 500 mM, β -mercaptoetanolo 10 mM, imidazolo 25 mM). La proteina è stata eluita con 10 volumi di tampone di eluizione (Tris HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, urea 500 mM, β -mercaptoetanolo 10 mM, imidazolo 250 mM). Da ciascuna frazione sono stati prelevati 100 μ l, aggiunti 25 μ l di *sample buffer* 5X e fatti bollire 5 minuti. Al resto di ciascuna frazione si sono aggiunti glicerolo 20% e DTT 2 mM. I campioni sono stati conservati a -80°C e successivamente caricati in gel denaturante di poliacrilammide 8%. Come riferimento è stato utilizzato il *marker* BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen). E' stata effettuata una corsa elettroforetica a voltaggio costante (160 V) per circa 45 min. Le frazioni contenenti la proteina in concentrazione maggiore sono state riunite e dializzate usando una *Slide-A-Lyzer* 10K (0,5-3 ml, 10000 MWCO, Pierce) in *storage buffer* (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 0,1 mM, glicerolo 30%, DTT 2 mM) per quattro ore in lenta agitazione a 4°C. La proteina dializzata è stata quantificata secondo metodo di Bradford (BioRad), utilizzando il kit Protein Assay (BioRad), aliquotata e conservata a -80°C.

3.9.b Espressione e purificazione della proteina di fusione GST-PB1(1-25)

Per purificare la proteina di fusione GST-PB1(1-25) un'aliquota di *E. coli* BL21(DE3)pLyS è stata elettroporata con 500 ng del plasmide pD15-PB1(1-25). Dopo aver fatto crescere la coltura O/N a 37°C in 20 ml di LB più ampicillina 100 μ g/ml, questa è stata diluita 1:50 in LB contenente ampicillina 100 μ g/ml e fatta crescere a 37°C fino al raggiungimento di OD₆₀₀ pari a 0,8-1. Quando la coltura ha raggiunto OD₆₀₀ 0,8-1 ne è stato prelevato 1 ml, centrifugato, ed il *pellet* risospeso in 100 μ l di *sample buffer* 1X e fatto bollire 5 minuti (campione pre-induzione). L'espressione proteica è stata indotta con IPTG 0,5 mM incubando a 16°C O/N. Al termine dell'induzione è stato prelevato 1 ml di coltura, centrifugato, risospeso in 100 μ l di *sample buffer* 1X e fatto bollire 5 minuti (campione post-induzione). La coltura è stata centrifugata ed il *pellet* risospeso in tampone di lisi (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, glicerolo 20%, DTT 5 mM, lisozima 1 mg/ml e inibitori di proteasi). La miscela è stata sottoposta a 2 cicli di congelamento/scongelo e a sonicazione (5 volte per 30").

Successivamente il lisato batterico è stato centrifugato per 30 minuti a 13000 rpm a 4°C. Dal surnatante sono stati prelevati 100 μ l, sono stati aggiunti 25 μ l di *sample buffer* 5X; il campione è stato fatto bollire 5 minuti (campione surnatante). E' stata preparata la colonna contenente la resina *glutathione sepharose-4 fast-flow* (Amersham), funzionalizzata con glutatione ridotto, ed è stata equilibrata con 10 volumi di tampone di lisi. Il surnatante è stato caricato in colonna ed è stato raccolto lo scarto; sono stati prelevati 100 μ l dello scarto, sono stati aggiunti 25 μ l di *sample buffer* 5X e sono stati fatti bollire 5 minuti (campione scarto). La colonna è stata lavata con 20 volumi di tampone di lavaggio (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, glicerolo 20%, DTT 5 mM). La proteina è stata eluita con 10 volumi di tampone di eluizione (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, glicerolo

20%, DTT 5 mM, glutatione 40 mM). Da ciascuna frazione sono stati prelevati 100 μ l, sono stati aggiunti 25 μ l di *sample buffer* 5X e sono stati fatti bollire 5 minuti. Al resto di ciascuna frazione sono stati aggiunti glicerolo 20%. I campioni sono stati conservati a -80°C e successivamente caricati in gel denaturante di poliacrilammide 12%. Come riferimento è stato utilizzato il *marker* BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen). E' stata effettuata una corsa elettroforetica a voltaggio costante (160 V) per circa 45 min. Le frazioni contenenti la proteina in concentrazione maggiore sono state riunite e dializzate usando una *Slide-A-Lyzer 10K* (0,5-3 ml, 10000 MWCO, Pierce) in *storage buffer* (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 0,1 mM, glicerolo 30%, DTT 2 mM) per quattro ore in lenta agitazione a 4°C. La proteina dializzata è stata quantificata mediante il metodo di Bradford (BioRad), aliquotata e conservata a -80°C.

3.9.c Analisi elettroforetica di proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE)

I campioni sono stati caricati in gel di poliacrilammide con SDS 0,1%. Come riferimento è stato utilizzato il *marker* BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen). E' stata effettuata una corsa elettroforetica a voltaggio costante (160 V) per circa 45 min in un tampone di corsa contenente Tris 0,3%, glicina 1,44%, SDS 0,1%.

Ciascun gel è stato poi incubato per 2 h in Blu Coomassie G-250 0,2% (Sigma), metanolo 40%, acido acetico 10% per la colorazione delle proteine, e decolorato per 1 h in metanolo 40%, acido acetico 10%.

3.9.d Determinazione della concentrazione proteica secondo il metodo di Bradford (BioRad protein assay)

Per determinare la concentrazione delle proteine purificate è stato utilizzato il BioRad *protein assay* che si basa sul metodo di Bradford; tale saggio permette di determinare la concentrazione totale di proteina tramite un metodo colorimetrico. Il metodo di Bradford si basa sull'azione del *Coomassie brilliant blue* G-250, un colorante che forma composti colorati con le proteine tramite legami elettrostatici tra proteine e gruppi sulfonici del colorante quando esso è in soluzione acida. Il *Coomassie blue* ha un picco di assorbanza a 475 nm (rosso), ma in ambiente acido, questo si sposta a 595 nm (blu) quando è legato a delle proteine. La quantità di colorante che si lega è proporzionale alla quantità di proteina presente in soluzione. Pertanto l'intensità del colore blu (e dunque l'assorbimento) è proporzionale alla concentrazione proteica.

Si può ricavare la concentrazione proteica tramite una retta di taratura costruita mettendo in relazione concentrazioni note di γ -globuline (standard) e la loro rispettiva assorbanza a 595 nm. L'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione delle proteine. Tramite lo standard si può risalire così alla concentrazione incognita delle proteine totali nel campione.

3.10 ELISA

E' stato fatto il *coating* in piastre da 96 pozzetti (Nuova Aptca) per 3 ore a 37°C con 50 μ l di 6His-PA (239-716) a concentrazione finale 400 ng/ μ l. La proteina 6His-PA (239-716) è

stata diluita in PBS 1X. Al termine dell'incubazione la proteina non legata è stata eliminata per inversione ed è stato fatto il bloccaggio con 100 µl di BSA 2% per 1 ora a 37°C. Successivamente sono stati fatti 5 lavaggi con 200 µl di PBS 1X e Tween 20 0.3% e si è incubato con 50 µl di GST-PB1 (1-25) o GST a concentrazione finale 200 ng/µl, in presenza o meno del peptide o dei composti a diverse concentrazioni, O/N a temperatura ambiente in camera umida. Le proteine GST-PB1 (1-25) e GST sono state diluite in PBS 1X. Dopo aver fatto 5 lavaggi con 200 µl di PBS 1X e Tween 20 0.3% ciascun pozzetto è stato incubato con anticorpo monoclonale anti-GST-HRP (GenScript, DBA Italia Cat. n. A00866) diluito 1:3000 in PBS 1X e FBS 2% per 1 ora a temperatura ambiente. Sono stati fatti 5 lavaggi con 200 µl di PBS 1X e Tween 20 0.3% e poi un'incubazione di 10 minuti circa a temperatura ambiente con 50 µl di 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB, KPL). La reazione è stata bloccata aggiungendo 50 µl di HCl diluito 1:6 in H₂O ed è stata letta l'assorbanza a 450 nm.

3.11 Saggio di BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*)

Le cellule HEK 293T sono state piastrate alla concentrazione di 2×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 6 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno seguente le cellule sono state trasfettate utilizzando il reagente Arrest-IN™ (Biosystems).

Sono state preparate le diverse mix di trasfezione, diluendo i plasmidi (0,3 µg di ciascun plasmide) pcDNA-PA-EGFP (158-239), pcDNA-PB1-EGFP (1-157) e pcDNA-PB2-EGFP (158-239) in 50 µl di terreno DMEM senza FBS e P/S. Successivamente sono stati diluiti 2,5 µg di Arrest-IN™ in 50 µl di terreno ai quali è stato aggiunto il DNA precedentemente diluito. Dopo aver mescolato velocemente, la miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 10 minuti. Sono stati poi aggiunti 150 µl di terreno ad ogni miscela in modo da arrivare a un volume finale di 250 µl. A questo punto la miscela è stata aggiunta alle cellule, le quali sono state in seguito incubate per 3-6 ore a 37°C. Terminata l'incubazione, è stato aggiunto un volume uguale (250 µl) di terreno con FBS 20% e i composti 100 µM. Le cellule sono state incubate per 24 ore a 37°C e successivamente le cellule sono state fissate e esaminate utilizzando un microscopio confocale Leica TCS-NT/SP2 con un obiettivo 63× e le immagini sono state analizzate utilizzando in software Leica.

3.12 Trascrizione e traduzione *in vitro* della proteina PB1

La proteina PB1 è stata trascritta e tradotta *in vitro* utilizzando il kit *TnT T7[®] Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega). Tale sistema permette la trascrizione e traduzione di una sequenza genica in un'unica reazione, in quanto utilizza una miscela di reazione (Quick master mix[®]) contenente sia i reagenti per la trascrizione (tra cui la RNA polimerasi del fago SP6 o del fago T7), sia un lisato di reticolociti di coniglio che contiene l'intero apparato di traduzione cellulare.

Utilizzando questo kit, circa 1 µg del plasmide è stato miscelato con 40 µl di Quick master mix[®] e con 2 µl di metionina marcata con [³⁵S] (GE Healthcare, 1000 Ci/mmol), in un volume finale di 50 µl. La miscela di reazione è stata incubata per 90 minuti ad una

temperatura di 30°C in un bagnetto termico. Al termine dell'incubazione i campioni sono stati analizzati e conservati a -20°C e utilizzati per il saggio di His-pulldown.

3.13 Saggio di *His-pulldown*

E' stata effettuata la trascrizione e traduzione *in vitro* (*in vitro translation*, IVT) del gene codificante la proteina da saggiare, utilizzando il kit *TnT T7[®] Quick Coupled Transcription/Translation System* come sopra descritto.

Quindi 20 µl della proteina tradotta *in vitro* e marcata con [³⁵S] metionina sono stati incubati con 30 µg della proteina purificata 6His-PA(239-716), in tampone di *binding* [0,2 µl di benzonase (Stratagene), 2,5 µl di RNase-It (RNase cocktail, Sigma) e una quantità di tampone (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 5 mM)] tale da raggiungere un volume di 100 µl in presenza dei composti 50 µM. L'incubazione è stata effettuata O/N a temperatura ambiente.

Durante l'incubazione sono state preparate colonnine contenenti 100 µl di resina NI-NTA agarose (Qiagen) funzionalizzata con il nichel, precedentemente lavate con 1 ml di tampone di lavaggio (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 5 mM, NP-40 2%, Triton X-100 2%). Dopo l'incubazione, le miscele contenenti le proteine sono state caricate in colonna; le colonne sono state lavate con tampone di lavaggio (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 5 mM, NP-40 2%, Triton X-100 2%) per eliminare le proteine legate in maniera aspecifica alla resina. Le proteine legate sono state eluite con un tampone di eluizione (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 150 mM, DTT 5 mM) contenente imidazolo 250 mM.

I campioni sono stati analizzati in gel di poliacrilammide e successiva autoradiografia.

3.14 Analisi elettroforetica di proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS-PAGE)

Dopo il saggio di *His-pulldown* ciascun campione da analizzare è stato miscelato con il tampone di caricamento [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerolo 10%, sodio dodecilsolfato (SDS) 2%, β-mercaptoetanololo 5%, blu di bromofenolo 0,5%]. I campioni così preparati sono stati fatti bollire per 5 minuti e successivamente caricati in gel di poliacrilammide 8%. Come riferimento è stato utilizzato il *marker BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen). E' stata effettuata successivamente una corsa elettroforetica a voltaggio costante (160 V) per circa 45 min in un tampone di corsa contenente Tris 0,3%, glicina 1,44%, SDS 0,1%.

La corsia del gel contenente il marker è stata tagliata e tenuta per 2 h in Blu Coomassie G-250 0,2% (Sigma), metanolo 40%, acido acetico 10% per la colorazione delle proteine, e decolorata per 1 h in metanolo 40%, acido acetico 10%. Il resto del gel è stato messo in soluzione di fissaggio (metanolo 30% e acido acetico 10%) per 1 h. Poiché le proteine da analizzare erano state precedentemente marcate con [³⁵S], dopo la corsa il gel è stato essiccato per due ore a 80° C (Gel Dryer Model 583, BioRad) e successivamente posto a contatto con una lastra fotografica (X-O-MATTM AR, Kodak) per tempi variabili fra le 12 e le 24 ore. Infine la lastra è stata rimossa e sviluppata.

3.15 Minireplicon assay Influenza A

Cellule HEK 293T sono state piastrate alla concentrazione di 2×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno seguente le cellule sono state trasfettate utilizzando polimeri cationici (Arrest-IN™, Biosystems): un polimero sviluppato e ottimizzato per veicolare in modo efficiente DNA o RNA nel nucleo di cellule eucariotiche: i polimeri proteggono l'acido nucleico durante il passaggio nel citoplasma e ne promuovono l'entrata nel nucleo. E' un metodo semplice, robusto, poco tossico e generalmente ha un'efficienza del 70-80%.

Sono state preparate le diverse mix di trasfezione, diluendo i plasmidi in 50 µl di terreno DMEM senza FBS e P/S in presenza o meno dei composti o degli Stealth siRNAs a diverse concentrazioni. Sono stati utilizzati 100 ng dei plasmidi pcDNA-PA, pcDNA-PB1, pcDNA-PB2 e pcDNA-NP, e 50 ng del plasmide contenente il gene reporter pPolI-Luc. Successivamente sono stati diluiti 2,5 µg di Arrest-IN™ in 50 µl di terreno ai quali è stata aggiunta la mix di plasmidi precedentemente diluita. Dopo aver mescolato velocemente, la miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 10 minuti. Sono stati poi aggiunti 150 µl di terreno ad ogni miscela in modo da arrivare a un volume finale di 250 µl. A questo punto la miscela è stata aggiunta alle cellule, le quali sono state in seguito incubate per 3-6 ore a 37°C. Terminata l'incubazione, è stato aggiunto un volume uguale (250 µl) di terreno con FBS 20% e i composti a diverse concentrazioni. Le cellule sono state incubate per 24 ore a 37°C e successivamente sono state lisate aggiungendo 50 µl di un buffer A per pozzetto (Tris fosfato 25 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, MgCl₂ 8 mM, DTT 1 mM) e incubando 2 minuti a RT in agitazione. In seguito sono stati aggiunti 50 µl di un buffer B per pozzetto (Tris fosfato 25 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, Triton X-100 1%, MgCl₂ 8 mM, glicerolo 30%, BSA 2%, ATP 0,8 mM, DTT 1 mM). Il lisato cellulare è stato centrifugato 1 minuto a 13000 rpm. Sono stati trasferiti 60 µl del lisato in una piastra adatta alla lettura di segnali di luminescenza (Costar®) e aggiunti 25 µl per pozzetto di luciferina 0,6 mM (Sigma). La luminescenza è stata letta al luminometro (Promega).

3.16 Minireplicon assay Influenza B

Cellule HEK 293T sono state piastrate alla concentrazione di 2×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno seguente le cellule sono state trasfettate utilizzando polimeri cationici (Arrest-IN™, Biosystems).

Sono state preparate le diverse mix di trasfezione, diluendo i plasmidi in 50 µl di terreno DMEM senza FBS e P/S in presenza o meno dei composti 50 µM. Sono stati utilizzati 100 ng dei plasmidi pCIP-PA, pCIP-PB1, pCIP-PB2 e pCIP-NP, e 50 ng del plasmide contenente il gene reporter pPolI-GFP-HA. Successivamente sono stati diluiti 2,5 µg di Arrest-IN™ in 50 µl di terreno ai quali è stata aggiunta la mix di plasmidi precedentemente diluita. Dopo aver mescolato velocemente, la miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 10 minuti. Sono stati poi aggiunti 150 µl di terreno ad ogni miscela in modo da arrivare a un volume finale di 250 µl. A questo punto la miscela è stata aggiunta alle cellule, le quali sono state in seguito incubate per 3-6 ore a 37°C. Terminata l'incubazione, è stato aggiunto un volume uguale (250 µl) di terreno con FBS 20% e i composti 50 µM. Le cellule sono state incubate per 24 ore a 37°C. L'espressione del gene reporter è stata osservata con microscopio a fluorescenza (Olympus 1X70).

3.17 Preparazione degli *stocks* virali

Per preparare gli *stocks* virali dei ceppi dell'influenza sono state infettate fiasche T25 contenenti circa $0,7 \times 10^6$ /ml MDCK ciascuna, seminate il giorno precedente, con MOI (*Multiplicity Of Infection*) 0.01-0.001 di ciascun ceppo virale diluito in terreno DMEM senza siero con BSA 0,14% e tripsina 1 $\mu\text{g/ml}$ (Worthingtons TRTVMP Trypsin TPCK treated, Biochemical Corporation). L'infezione è stata condotta per un'ora a 37°C; al termine, le cellule infettate sono state incubate con 5 ml di terreno DMEM senza siero con BSA 0,14% e tripsina 1 $\mu\text{g/ml}$ per 2 giorni a 37°C finché non si osserva che le cellule sono infettate e quindi non adese alla plastica. Al termine le cellule sono state raccolte in una Falcon da 15 ml e centrifugate per 5 minuti a 1800 rpm a 4°C. Il surnatante così ottenuto è stato poi aliquotato e congelato a -80°C.

3.18 Titolazione degli *stocks* virali dei ceppi di influenza

Per titolare gli *stocks* di influenza cellule MDCK sono state piastrate alla concentrazione di $0,7 \times 10^6$ cellule/pozzetto in una piastra da 12 pozzetti in doppio e incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo sono state infettate con 250 μl di diluizioni seriali 1:10 degli *stocks* virali (da 10^{-2} a 10^{-8}) per un'ora a 37°C. Un pozzetto per piastra non è stato infettato in modo da avere un controllo negativo del monostrato cellulare non infettato. Al termine dell'incubazione le cellule sono state incubate con 1 ml per pozzetto di terreno DMEM senza siero con BSA 0,14% e tripsina 1 $\mu\text{g/ml}$ contenente cellulosa Avicel 1,2% (w/v; FMC) per 2 giorni a 37°C. Al termine il monostrato cellulare è stato fissato con 1 ml per pozzetto di Formaldeide al 4% in PBS 1X. Dopo circa mezz'ora le cellule sono state colorate con 1 ml di Toluidine Blue 0,1% (w/v) in H₂O, lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state in seguito contate le placche virali formatesi in ciascun pozzetto e il titolo degli *stocks* virali è stato determinato per ogni diluizione applicando la formula seguente:

Numero di placche a una certa diluizione x fattore di diluizione x 5 =
Titolo virale in PFU/ml

La media tra i valori di PFU/ml (*Plaque Forming Units*, unità formanti placca) calcolate per le varie diluizioni permette di determinare il titolo dello *stock*.

3.19 Saggi di citotossicità

La citotossicità dei composti è stata determinata in differenti linee cellulari (HEK 293T, MDCK, A549, HSB-2) utilizzando il metodo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoliumbromide] secondo il protocollo del "Cell Proliferation Kit I" (Boehringer Mannheim). Questo metodo è un saggio enzimatico colorimetrico che permette di quantificare l'attività delle deidrogenasi mitocondriali presenti in cellule metabolicamente attive. È un metodo sensibile, di facile esecuzione e veloce.

Le cellule HEK 293T, MDCK e A549 sono state piastrate alla concentrazione di $2 \times 10^4/100$ μ l per pozzetto in piastre da 96 pozzetti e trattate per 24 ore le cellule HEK 293T e per 48 ore le cellule MDCK e A549 con varie concentrazioni di ogni composto diluito in DMEM. Le cellule HSB-2 sono state piastrate alla concentrazione di $1 \times 10^4/50$ μ l per pozzetto in piastre da 96 pozzetti e trattate per 48 ore con varie concentrazioni di ogni composto diluito in RPMI.

Per determinare la citotossicità degli Stealth siRNAs cellule HEK 293T sono state piastrate alla concentrazione di $2 \times 10^4/100$ μ l per pozzetto in piastre da 96 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno seguente le cellule sono state trasfettate con diverse concentrazioni di ciascuno Stealth siRNAs utilizzando polimeri cationici (Arrest-IN™, Biosystems) e incubate 24 ore a 37°C.

La concentrazione finale di DMSO derivante dalla soluzione del composto è stata mantenuta allo 0,1% (v/v) in tutti i campioni. Nei campioni non trattati con i composti è stato aggiunto un volume appropriato di DMSO puro in modo da ottenere una concentrazione finale dello 0,1%.

Terminata l'incubazione sono stati aggiunti 10 μ l/pozzetto di MTT 5 mg/ml in PBS 1X. Dopo 4 ore a 37°C sono stati aggiunti 100 μ l per pozzetto di soluzione solubilizzante (SDS 10%, HCl 0,01N). Le cellule sono state incubate per 3 ore a 37°C. L'assorbanza è stata letta a 550 nm con un lettore ELISA per micropiastre e comparata con i valori relativi alle cellule non trattate di controllo.

3.20 Saggi di attività antivirale

3.20.a Saggi di riduzione delle placche con Flu, HSV-1 e VSV

Cellule MDCK sono state seminate alla densità di $0,7 \times 10^6/ml$ per pozzetto in piastre da 12 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo le cellule sono state infettate con Flu (ceppo A/PR/8/34, o A/WSN/67/05, o A/Solomon Island/3/06, o A/PARMA/24/09 o B/malaysia/2506/4) con 20-30 PFU per pozzetto in DMEM senza FBS con BSA 0,14%, Tripsina 1 μ g/ml e diverse concentrazioni dei composti da saggiare per un'ora a 37°C.

Al termine dell'infezione è stato aggiunto terreno DMEM senza siero con BSA 0,14%, tripsina 1 μ g/ml contenente cellulosa Avicel 1,2% e diverse concentrazioni dei composti da saggiare. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ogni esperimento. Dopo un'incubazione di 2 giorni in ambiente umidificato a 37°C, il monostrato cellulare è stato fissato con 1 ml per pozzetto di Formaldeide al 4% in PBS (*Phosphate Saline Buffer*) 1X. Dopo circa mezz'ora le cellule sono state colorate con 1 ml di Toluidine Blue 0,1% (w/v) in H₂O, lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state in seguito contate le placche virali formatesi in ciascun pozzetto.

La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta al 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stato aggiunto un volume di DMSO tale per cui la concentrazione finale fosse del 0,1%.

Cellule Vero e L929 sono state seminate rispettivamente alla densità di $1 \times 10^5/ml$ o $4 \times 10^5/ml$ per pozzetto in piastre da 24 pozzetti o 12 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo le cellule sono state infettate rispettivamente con 50-100 PFU di HSV-1 (ceppo F) o con 30-50 PFU di VSV per pozzetto in DMEM senza FBS con P/S 1% a 37°C.

Un'ora dopo l'infezione per HSV-1 e due ore dopo per VSV è stato rimosso l'inoculo virale, le cellule sono state lavate con PBS 1X ed è stato aggiunto terreno completo (DMEM con FBS 5% e P/S) contenente metilcellulosa 0,6% (Sigma-Aldrich) e diverse concentrazioni dei composti da saggiare. Tutte le concentrazioni dei composti sono state saggiate in doppio in ogni esperimento. Dopo un'incubazione di 2 giorni in ambiente umidificato a 37°C, il monostrato cellulare è stato fissato con 1 ml per pozzetto di Formaldeide al 4% in H₂O. Dopo circa mezz'ora le cellule sono state colorate con 1 ml di Toluidine Blue 0,1% in H₂O lavate con acqua e lasciate asciugare. Sono state in seguito contate le placche virali formatesi in ciascun pozzetto.

La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta al 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro tale per cui la concentrazione finale fosse del 0,1%.

3.20.b Analisi dell'espressione proteica virale con esperimenti di pulse-chase

Cellule MDCK sono state seminate alla densità di 2×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo le cellule sono state infettate con il virus A/PR/8/34 a MOI 5 in DMEM senza FBS con BSA 0,1% e Tripsina 1 µg/ml e i composti da saggiare 50 µM per un'ora a 37°C.

La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta al 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro tale per cui la concentrazione finale fosse del 0,1%.

Al termine dell'infezione è stato aggiunto terreno DMEM senza siero con BSA 0,14%, tripsina 1 µg/ml e i composti 50 µM. Dopo un'incubazione di 11 ore in ambiente umidificato a 37°C alle cellule è stato aggiunto DMEM e 1 µl di [³⁵S] Met (10 µCi/µl). Dopo un'incubazione di un'ora a 37°C è stato aggiunto il tampone di caricamento (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerolo 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanolo 5%, blu di bromofenolo 0,5%), trasferito in Eppendorf e conservato a -20°C. I campioni sono stati analizzati in gel di poliacrilammide 8% e successiva autoradiografia al fine di valutare il livello di espressione proteica (vedi paragrafo 3.14).

3.20.c Effetto dei composti sulla replicazione virale a diversi tempi e concentrazioni post-infezione

Cellule MDCK sono state seminate alla densità di 2×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo le cellule sono state infettate con il virus A/PR/8/34 a MOI 0,005 in DMEM senza FBS con BSA 0,14%, tripsina 1 µg/ml e i composti da saggiare a diverse concentrazioni per un'ora a 37°C.

La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta al 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro tale per cui la concentrazione finale fosse del 0,1%.

Un'ora dopo l'infezione è stato aggiunto terreno DMEM senza siero con BSA 0,14%, tripsina 1 µg/ml e i composti 50 µM finali o a diverse concentrazioni. Dopo un'incubazione di 4, 8, 12, 24 e 48 ore in ambiente umidificato a 37°C sono stati raccolti i

surnatanti e titolati. Lo stesso esperimento è stato ripetuto aggiungendo terreno fresco con i composti a diverse concentrazioni dopo 12 e 24 ore dall'infezione e raccogliendo i surnatanti 12, 24 e 48 ore post-infezione.

3.20.d Effetto dei composti durante un singolo ciclo di replicazione virale

Cellule MDCK sono state seminate alla densità di 2×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno successivo le cellule sono state infettate con il virus A/PR/8/34 a MOI 5 in DMEM senza FBS con BSA 0,14%, tripsina 1 µg/ml e i composti da saggiare a diverse concentrazioni per un'ora a 37°C.

La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta al 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro tale per cui la concentrazione finale fosse del 0,1%.

Al termine dell'infezione le cellule sono state trattate con soluzione di lavaggio (NaCl 150 mM, HCl 10 mM) per un minuto, lavate tre volte con PBS 1X e aggiunto terreno DMEM senza siero con BSA 0,14%, tripsina 1 µg/ml e i composti da saggiare a diverse concentrazioni. Dopo un'incubazione di 12 ore in ambiente umidificato a 37°C sono stati raccolti i surnatanti e titolati.

3.20.e Saggio di inibizione della traslocazione del complesso PA/PB1

Cellule HEK 293T sono state piastrate alla concentrazione di 2×10^5 /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e incubate O/N a 37°C. Il giorno seguente le cellule sono state trasfettate utilizzando polimeri cationici (Arrest-IN™ Biosystems).

Sono state preparate le diverse mix di trasfezione, diluendo i plasmidi pcDNA-GFP-PA e pcDNA-PB1 o pcDNA-PB2 come controllo in 50 µl di terreno DMEM senza FBS e P/S in presenza o meno dei composti 50µM. Successivamente sono stati diluiti 2,5 µg di Arrest-IN™ in 50 µl di terreno ai quali è stata aggiuntala mix di plasmidi precedentemente diluita. Dopo aver mescolato velocemente, la miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 10 minuti. Sono stati poi aggiunti 150 µl di terreno ad ogni miscela in modo da arrivare a un volume finale di 250 µl. A questo punto la miscela è stata aggiunta alle cellule, le quali sono state in seguito incubate per 3-6 ore a 37°C. Terminata l'incubazione, è stato aggiunto un volume uguale (250 µl) di terreno con FBS 20% e i composti a diverse concentrazioni. Le cellule sono state incubate per 12 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule sono state fissate, colorate con DAPI e analizzate mediante microscopio a fluorescenza (Olympus 1X70).

4. Risultati e discussione

4.1 *Screening in silico*

Lo *screening in silico* è stato condotto utilizzando la struttura cristallografica depositata da He *et al.* (3CM8) in Protein Data Bank (He *et al.*, 2008).

La subunità PA nella struttura riportata da He *et al.* 3CM8 è stata considerata il bersaglio, mentre il peptide corrispondente agli aa 1-25 di PB1 è stato considerato come ligando. Il ligando è stato virtualmente rimosso dalla cavità e le due strutture di PA e di PB1 sono state modellate separatamente.

Per un approccio *in silico* è necessario analizzare in primo luogo le caratteristiche intrinseche delle proteine in esame (PA e PB1). Il sito di legame di PA con il frammento di PB1 è stato analizzato utilizzando i campi di interazione molecolare (MIFs) generati dal software GRID. Questa cavità risulta essere piuttosto idrofobica, e ciò è in accordo con il fatto che la regione di PB1 che interagisce con PA è caratterizzata da 5 legami a idrogeno intramolecolari che ne determinano una struttura piuttosto rigida e idrofobica in superficie. Grazie all'utilizzo di FLAP (Fingerprint for ligand and protein), un software di modellistica molecolare, è stato possibile ricavare dai MIFs alcuni punti in cui è massimale l'energia di interazione tra le sub unità (Perrucio *et al.*, 2006; Baroni *et al.*, 2007).

I punti così selezionati corrispondono a una precisa coordinata spaziale nel sito attivo di PA e ad una precisa interazione chimica (idrofobica, accettore di legame a idrogeno, donatore di legame a idrogeno). Un punto idrofobico della proteina tenderà ad essere esposto ad un punto idrofobico del ligando, mentre un donatore di legame ad idrogeno della proteina tenderà ad essere esposto ad un punto accettore del ligando e viceversa.

E' stato quindi utilizzato FLAP per condurre uno *screening* virtuale, sulla base dei punti selezionati, di circa 3 milioni di composti presenti nel database ZINC, valutando la similarità tra le molecole presenti nel database e la cavità di PA sia dal punto di vista sterico che chimico. Questa procedura, unita all'applicazione di un *software* di *docking* (GLUE) ha consentito di selezionare circa 34000 molecole dal database iniziale.

Tali molecole sono state ulteriormente processate sulle 8 conformazioni più stabili della proteina, ricavate da studi di dinamica molecolare. Imponendo vincoli più restrittivi (da un punto di vista energetico) si è ridotto ulteriormente il numero delle molecole, ottenendone circa 300.

Sebbene tale risultato sia sperimentalmente maneggiabile, un numero così elevato di composti risulta difficile da saggiare in laboratorio, perciò si è scelto di ridurre ulteriormente il numero delle molecole.

Al fine di selezionare tra le 300 molecole solo quelle potenzialmente più interessanti, le molecole virtuali sono state modellate con un software che permette di valutare le proprietà farmacocinetiche dei composti in esame (chiamate anche proprietà ADME). Si è deciso di utilizzare solo molecole con appropriate proprietà farmacocinetiche, ossia aventi ben definiti valori per proprietà tipo Assorbimento Distribuzione Metabolismo ed Escrezione.

Attraverso tale studio è stato possibile selezionare 65 molecole che rispondevano ai giusti requisiti ADME. Di queste 65 molecole caratterizzate, 32 erano disponibili in commercio e sono state acquistate.

Le molecole sono state caratterizzate con diversi saggi *in vitro* e cellulari. Una volta individuate strutture con una certa attività, sono stati cercati analoghi di questi composti usando FLAP non più per trovare la similarità fra cavità di PA e ligando, ma direttamente

la similarità fra il composto attivo e altre molecole presenti in *databases* commerciali, quindi uno *screening* non più basato sulla struttura della proteina ma direttamente su un ligando attivo. Sono stati così trovati analoghi di alcuni composti con lo scopo di cercare di identificare un composto che avesse un'attività antivirale sempre maggiore.

4.2 Creazione delle proteine di fusione GST-PB1 (1-25) e pET28a-PA (239-716)

Per saggiare capacità dei composti di inibire l'interazione fisica tra PA e PB1 è stato condotto in primo luogo un ELISA utilizzando le proteine purificate PA aa 239-716 e PB1 aa 1-25. Sono stati utilizzati questi residui delle due proteine, come riportato in Obayashi *et al.*, in quanto sono entrambe proteine molto grandi e di difficile espressione in *E. coli* nella forma intera. Inizialmente i geni esprimenti PA aa 239-716 e PB1 1-25 sono stati clonati rispettivamente in pET28a e in pD15.

Per creare il plasmide pD15-PB1 (1-25), esprime il gene codificante PB1 (1-25), è stato amplificato con PCR dal plasmide pcDNA3-PB1 utilizzando i *primers* pD15-PB1 1-25/FOR e pD15-PB1 1-25/REV, contenenti rispettivamente i siti di restrizione per XhoI e MluI. PB1 è stata clonata nel vettore Zero BLUNT TOPO utilizzando il Zero BLUNT TOPO PCR Cloning Kit. Successivamente, utilizzando gli enzimi di restrizione XhoI e MluI sono stati tagliati sia pD15-UL44 (questo taglio produce un frammento di 1400 bp contenente UL44 e un frammento di circa 5400 bp, corrispondente al resto del plasmide) sia Zero BLUNT TOPO-PB1 (1-25) (questo taglio produce un frammento di 75 bp contenente PB1 (1-25) e un frammento di circa 3500 bp, corrispondente al resto del plasmide). Dopo aver caricato in gel di agarosio (1% per il pD15 e 3% per il frammento PB1 1-25) i prodotti di restrizione e purificato i frammenti di interesse, ne abbiamo fatto la ligazione. In seguito abbiamo verificato l'avvenuto clonaggio sia attraverso analisi di restrizione (utilizzando gli enzimi XhoI e MluI) e sia con sequenziamento utilizzando i *primers* pD15seq/FOR e pD15seq/REV che permettono il sequenziamento delle regioni di giunzione tra il plasmide e il frammento di DNA clonato. Abbiamo quindi ottenuto il plasmide pD15-PB1 (1-25) (di circa 5500 bp).

Per creare il plasmide pET28a-PA (239-716), esprime il gene codificante PA (239-716), è stato amplificato con PCR dal plasmide pcDNA3-PA utilizzando i *primers* pET28aPA239716/FOR e pET28aPA239716/REV, contenenti rispettivamente i siti di restrizione per EcoRI e NotI. PA (239-716) è stata clonata in Zero BLUNT TOPO utilizzando Zero BLUNT TOPO PCR Cloning Kit. Successivamente, utilizzando gli enzimi di restrizione EcoRI e NotI sono stati tagliati sia pET28a sia Zero BLUNT TOPO-PA (239-716). Dopo aver caricato in gel di agarosio 1% i prodotti di restrizione e purificato i frammenti di interesse, ne abbiamo fatto la ligazione. In seguito abbiamo verificato l'avvenuto clonaggio sia attraverso analisi di restrizione (utilizzando gli enzimi EcoRI e NotI) sia con sequenziamento utilizzando i *primers* T7/FOR e T7/REV che permettono il sequenziamento delle regioni di giunzione tra il plasmide e il frammento di DNA clonato. Abbiamo quindi ottenuto il plasmide pET28a-PA (239-716) (di circa 6800 bp).

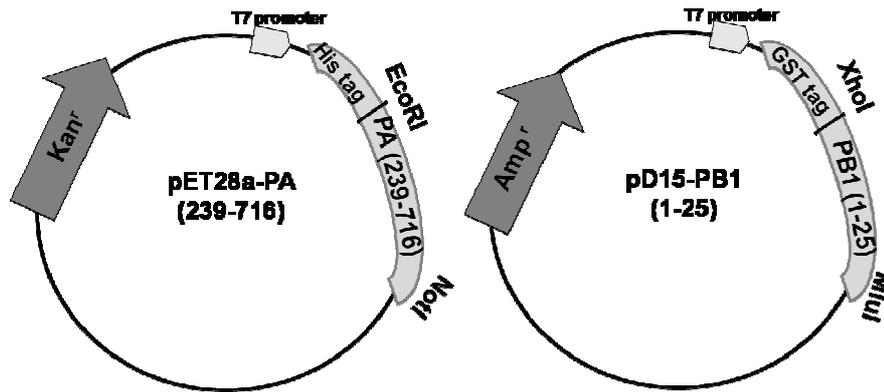


Figura 20. Clonaggio di PA (239-716) in pET28a e di PB1 (1-25) in pD15.

4.3 Purificazione della proteina di fusione 6His-PA (239-716)

E' stata successivamente condotta l'espressione e purificazione della proteina 6His-PA (239-716) attraverso cromatografia di affinità per poterla utilizzare nei successivi ELISA.

L'espressione della proteina 6His-PA (239-716) è stata effettuata a partire dal plasmide pET28a-PA (239-716) che consente l'espressione del gene di interesse a partire dal promotore T7 riconosciuto dalla RNA polimerasi del fago T7. Cellule elettrocompetenti *E. coli* BL21(DE3) pLys sono state quindi trasformate con tale plasmide. La coltura ottenuta è stata poi fatta crescere sino a raggiungere una OD₆₀₀ pari a 0,8-1. Raggiunto tale valore, l'espressione della proteina 6His-PA (239-716) è stata indotta con IPTG.

Al termine dell'induzione abbiamo centrifugato l'intera coltura e conservato i *pellets* per la purificazione. I *pellets* ottenuti quindi sono stati risospesi in un tampone di lisi. Per la purificazione abbiamo sfruttato la cromatografia per affinità, utilizzando una resina costituita da nichel e acido nitrilotriacetico (Ni-NTA). Questo tipo di resina permette il legame della sua matrice con biomolecole che contengono nella loro struttura 6 residui di istidina consecutivi; questo legame avviene perché i 6 residui di istidina (contenuti nella proteina da purificare) interagiscono con gli ioni di nichel immobilizzati sulla matrice NTA legandosi saldamente. Le proteine, invece, che non contengono le sei istidine non legheranno gli ioni di nichel e quindi saranno immediatamente eluite dalla colonna. Il surnatante ottenuto dalla precipitazione del lisato cellulare è stato caricato in una colonna con la resina Ni-NTA (Qiagen) e fatto fluire per gravità. Successivamente la colonna è stata lavata con tampone di lavaggio ed infine la proteina di interesse 6His-PA (239-716) è stata eluita dalla resina.

Durante l'eluizione sono state raccolte 10 frazioni (E1-E10), da ciascuna frazione sono stati prelevati dei campioni analizzati successivamente in gel di poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE).

Come si evince dalla **Figura 21**, la proteina è stata espressa nelle cellule batteriche, infatti si può notare una banda arricchita corrispondente al peso molecolare atteso (di circa 53 kDa) nel campione prelevato post-induzione (corsia 2) che non risulta invece presente nel campione prelevato pre-induzione (corsia 1). Inoltre le frazioni eluite che contengono la maggior quantità di proteina 6His-PA (239-716) sono: E1, E2, E3 e E4 (corsia 7, 8, 9 e

10). Queste frazioni sono state riunite, dializzate contro un opportuno tampone in modo da eliminare l'imidazolo presente nel buffer di eluizione che avrebbe potuto interferire con i saggi successivi e la proteina 6His-PA (239-716) in esse contenuta è stata quantificata mediante saggio di Bradford. In seguito alla quantificazione si è potuto verificare che partendo da 12 L di coltura batterica si sono ottenuti circa 22 mg di proteina con un soddisfacente grado di purezza.

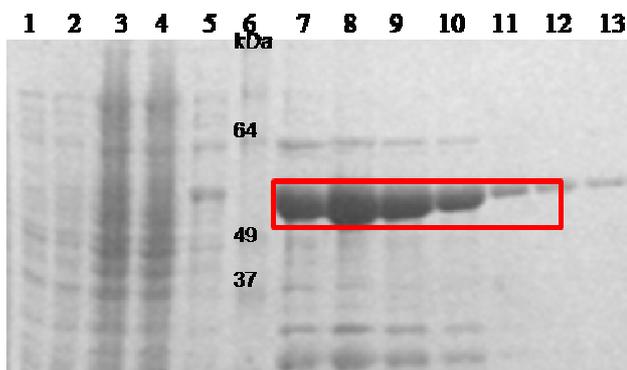


Figura 21. SDS-PAGE dei campioni raccolti durante la purificazione della proteina 6His-PA (239-716). (1) lisato cellulare post-induzione, (2) campione pre-induzione, (3) surnatante ottenuto dopo lisi e centrifugazione delle cellule, (4) materiale eluito dalla colonna durante il caricamento del campione, (5) lavaggio; (7-13) alcune delle frazioni eluite dalla colonna (E1-E7).

4.4 Purificazione della proteina di fusione GST-PB1 (1-25)

La proteina GST-PB1 (1-25) è stata espressa e purificata mediante cromatografia di affinità per poterla utilizzare nei successivi ELISA.

La coltura trasformata è stata fatta crescere fino ad una OD_{600} pari a 0,8-1; in questo caso la colonna utilizzata per la cromatografia conteneva la resina *Glutathione-Sepharose*. Questo tipo di resina permette il legame di proteine fuse con la glutathione-S transferasi (GST). Il surnatante ottenuto dalla precipitazione del lisato cellulare è stato fatto passare in colonna, la GST-PB1 (1-25) contenuta in esso si è legata alla matrice ed è stata successivamente eluita con un *buffer* di eluizione contenente il glutathione libero. In questo protocollo di purificazione il glutathione libero in eccesso compete con il glutathione coniugato alla matrice spiazzando la proteina di fusione legata, che andrà così nella fase mobile e potrà essere raccolta nelle frazioni eluite.

Durante l'eluizione sono state raccolte 10 frazioni (E1-E10), da ciascuna frazione sono stati prelevati dei campioni analizzati successivamente in gel di poliacrilammide denaturante (SDS-PAGE).

Come si evince dalla **Figura 22**, la proteina GST-PB1 (1-25) è stata espressa in buone quantità in quanto si è potuta osservare la presenza di una banda arricchita al peso molecolare atteso di circa 28 kDa nel campione post-induzione (corsia 2) che non risulta presente nel campione pre-induzione (corsia 1).

Dall'analisi in SDS-PAGE è inoltre emerso che le frazioni eluite che contenevano la maggior quantità di proteina GST-PB1 (1-25) erano E2, E3 ed E4 (corsia 9, 10, 11). Queste frazioni sono state riunite e dializzate in modo da eliminare il glutathione presente

nel tampone di eluizione e per ottenere la proteina in un tampone idoneo alla sua conservazione a -80°C ; successivamente la proteina purificata è stata quantificata con il metodo di Bradford. Partendo da 12 L di coltura batterica sono stati ottenuti circa 6 mg di proteina purificata.

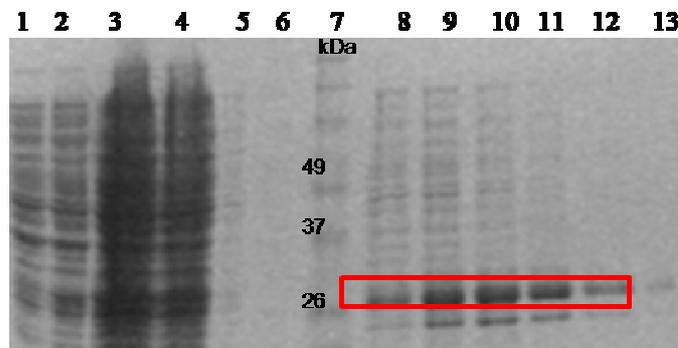


Figura 22. SDS-PAGE dei campioni raccolti durante la purificazione della proteina GST-PB1 (1-25). (1) lisato cellulare pre-induzione, (2) campione post-induzione, (3) surnatante ottenuto dopo lisi e centrifugazione delle cellule, (4) materiale eluito dalla colonna durante il caricamento del campione, (5, 6) lavaggi ed infine (8-13) alcune delle varie frazioni eluite dalla colonna (E1-E6).

4.5 ELISA con le proteine purificate 6His-PA (239-716) e GST-PB1 (1-25)

In seguito è stato messo a punto un ELISA per saggiare la capacità dei composti, o del peptide Tat-PB1₁₋₁₅ come controllo, di dissociare l'interazione *in vitro* delle proteine PA e PB1. E' stato scelto questo saggio in quanto è in grado di misurare in maniera specifica e quantitativa l'interazione tra le due proteine. Gli ELISA sono stati condotti utilizzando le proteine 6His-PA (239-716) e GST-PB1 (1-25) purificate come sopra descritto.

In questo saggio è stato fatto il *coating* utilizzando la proteina 6His-PA (239-716) e successivamente è stata aggiunta la proteina GST-PB1 (1-25) o GST da sola come controllo. Il legame tra le due proteine è stato determinato utilizzando un anticorpo monoclonale che riconosce il tag GST ed è direttamente coniugato con la perossidasi. Aggiungendo il substrato per l'enzima, il TMB, e leggendo i valori di assorbanza è stato possibile rilevare l'interazione tra le due proteine.

Dopo aver messo a punto il saggio ne è stata valutata la capacità di misurare, in maniera specifica, l'interazione PA-PB1, l'inibizione dell'interazione e l'effetto del solvente sul legame tra le due proteine. La **Figura 23** mostra come in questo saggio le proteine 6His-PA(239-716) e GST-PB1 (1-25) interagiscono tra di loro, infatti aumentando la concentrazione di GST-PB1 (1-25) e tenendo costante la concentrazione di 6His-PA (239-716) i valori di assorbanza aumentano dimostrando un aumento di legame proporzionale alla quantità di proteina aggiunta. I valori di assorbanza, invece, ottenuti dall'interazione di 6His-PA (239-716) con GST da sola sono inferiori e vicini allo zero dimostrando un'assenza di interazione tra le due proteine. Questo conferma che il saggio da noi messo a punto è in grado di rilevare l'interazione tra PA e PB1 in modo specifico.

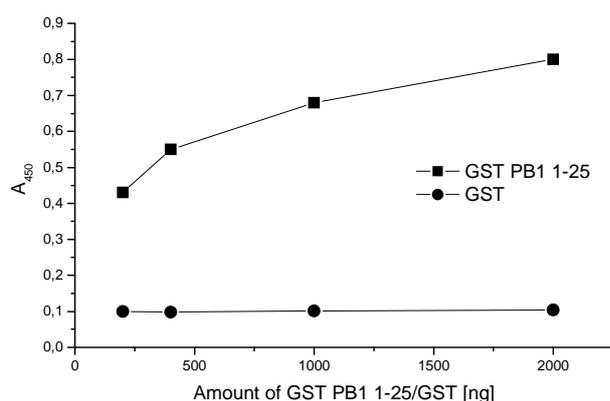


Figura 23. Interazione tra 6His-PA (239-716) e GST-PB1 (1-25) o GST da sola come controllo.

Per determinare se questo tipo di saggio fosse in grado di identificare inibitori dell'interazione tra PA e PB1, è stato condotto un esperimento in cui le due proteine 6His-PA (239-716) (400 ng/pozzetto) e GST-PB1 (1-25) o GST (200 ng/pozzetto) sono state incubate in presenza del peptide Tat-PB1₁₋₁₅ che corrisponde alla regione di PB1 che interagisce con PA, o della proteina 6His-PA (239-716) come controllo (in quanto in questo saggio funge da competitore) a diverse concentrazioni. È stato scelto di utilizzare 200 ng di GST-PB1 (1-25) perché è la concentrazione minima di proteina che permette di ottenere una differenza rilevabile e consistente tra i valori di assorbanza di 6His-PA (239-716)/ GST-PB1 (1-25) e 6His-PA (239-716)/ GST. Come si può osservare dalla figura riportata (**Figura 24**) entrambi gli inibitori causano diminuzione dei valori di assorbanza rispetto al controllo non trattato. Questo saggio quindi è in grado di rilevare l'inibizione dell'interazione PA/PB1.

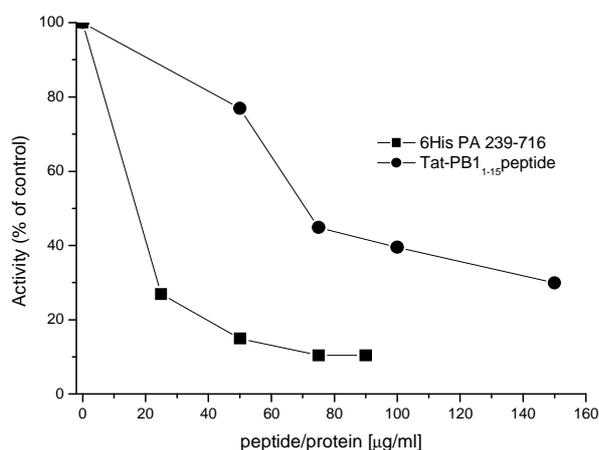


Figura 24. ELISA con le proteine 6His-PA (239-716) e GST-PB1 (1-25), e il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ o la proteina 6His-PA(239-716) come controllo.

Successivamente è stato valutato l'effetto del solvente DMSO, in cui sono solubilizzati i composti, sulla capacità di legame PA/PB1. Dal grafico (**Figura 25**) si può osservare come il solvente non interferisca con l'interazione tra le due proteine in quanto i valori di assorbanza non diminuiscono all'aumentare del solvente.

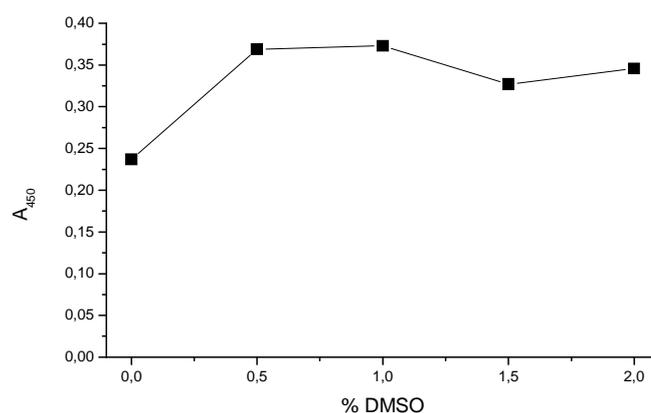


Figura 25. Effetto del solvente sull'interazione PA/PB1.

In seguito a queste analisi sono stati saggiati con questo ELISA i 32 composti identificati mediante lo *screening in silico*. Inizialmente i composti sono stati saggiati a due diverse concentrazioni (50 e 100 μ M). Quello che è emerso è che 14 su 32 composti erano in grado di causare una diminuzione dei valori di assorbanza (**Tabella 4**) e quindi di interferire con l'interazione PA/PB1.

Tabella 4. Attività dei composti in ELISA: + attivo, - non attivo, +/- debolmente attivo.

Compound	Activity	Compound	Activity
1	±	17	-
2	-	18	+
3	-	19	-
4	±	20	±
5	+	21	±
6	±	22	±
7	-	23	-
8	+	24	-
9	±	25	-
10	+	26	-
11	±	27	-
12	+	28	-
13	-	29	-
14	-	30	-
15	-	31	+
16	-	32	-
		Tot-PB1 1-15	+

I 14 composti risultati attivi in questo primo *screening* sono stati successivamente sottoposti a un'analisi mirata a valutare la dose-dipendenza dell'effetto inibitorio. E' stato

condotto un ELISA analogo in cui i composti sono stati aggiunti a diverse concentrazioni. I valori di assorbanza ottenuti sono stati riportati in valore percentuale considerando il controllo non trattato con i composti come 100% e poi utilizzati per costruire un grafico che mette in relazione l'attività inibitoria espressa in questo valore percentuale (valore percentuale rispetto al controllo non trattato) con la concentrazione di composto utilizzato (Figura 25).

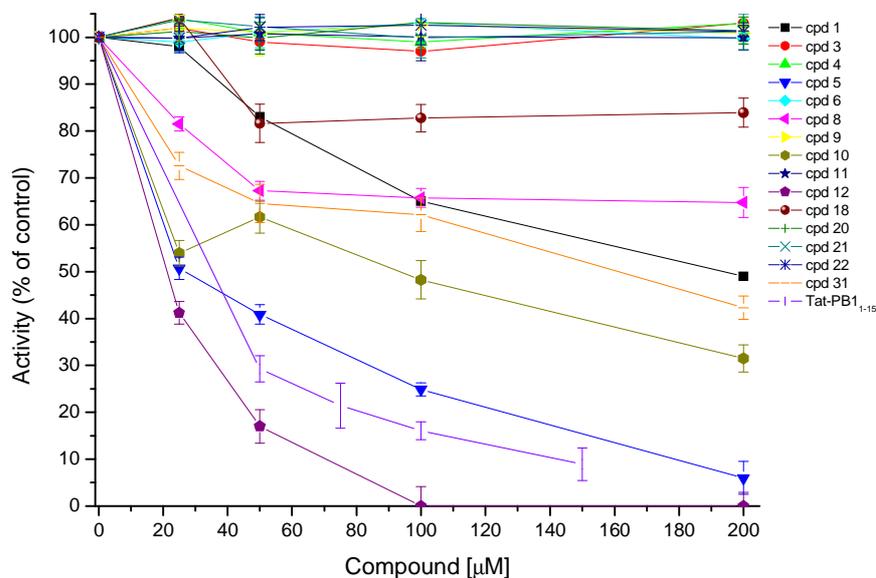


Figura 26. Dose-dipendenza dell'attività inibitoria dei composti.

Tabella 5. Il valore di IC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che riduce l'interazione PA/PB1 del 50% in ELISA; *: inibizione non dose-dipendente.

Compound	IC_{50} (μM)
1	200 μM
3 (negative control)	-
4	*
5	25 μM
6	*
8	> 200 μM
9	*
10	90 μM
11	*
12	20 μM
18	> 200 μM
20	*
21	*
22	*
31	170 μM
Tat PB1 ₁₋₁₅ peptide (positive control)	35 μM

Come si può osservare nella **Tabella 5**, i composti 5, 10 e 12 inibiscono l'interazione PA/PB1 in maniera dose-dipendente con valori di IC_{50} comparabili a quello del peptide di controllo. I composti 1, 8, 18 e 31, invece, inibiscono l'interazione PA/PB1 in maniera dose-dipendente con valori di IC_{50} maggiori rispetto a quello del controllo positivo. Gli altri composti, invece, non inibiscono l'interazione PA/PB1 in maniera dose-dipendente. Successivamente per valutare la specificità dell'attività inibitoria dei composti è stato condotto un ELISA utilizzando un composto non correlato, AL5, che inibisce l'interazione tra le subunità della DNA polimerasi di HCMV. Il grafico riportato (**Figura 27**) mostra come tale composto non causi una diminuzione dell'attività e quindi non interferisca con l'interazione PA/PB1, a conferma della specificità dell'attività inibitoria dei composti saggiati.

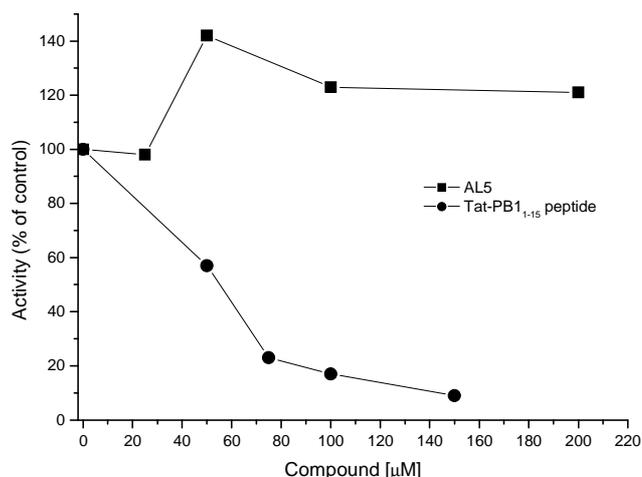


Figura 27. Determinazione della specificità dell'attività inibitoria dei composti mediante ELISA.

4.6 Studio dell'effetto dei composti sull'interazione PA/PB1 in un contesto cellulare

Dopo aver selezionato mediante ELISA composti in grado di inibire l'interazione PA/PB1 in vitro si è voluto verificare se essi fossero in grado di inibire la stessa interazione anche in un contesto cellulare. A questo scopo si è deciso di utilizzare un saggio basato su Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). In questo saggio, cellule HEK 293T vengono trasfettate con plasmidi esprimenti PA e PB2 fuse alle metà C-terminale della enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) e PB1 fusa alla metà N-terminale. Le due porzioni isolate della eGFP non emettono fluorescenza singolarmente, tuttavia, in seguito all'interazione PA/PB1, la GFP si ricostituisce e di conseguenza le cellule trasfettate emetteranno un segnale rivelabile mediante microscopia a fluorescenza. Al contrario, un composto capace di impedire l'interazione PA/PB1 all'interno delle cellule eliminerà la fluorescenza in cellule trasfettate e trattate con i composti.

4.6.a Creazione dei plasmidi pcDNA-PA-EGFP (158-239), pcDNA-PB1-EGFP (1-157) e pcDNA-PB2-EGFP (158-239).

Per creare il plasmide pcDNA3.1-PB1-EGFP (1-157), il gene codificante PB1 è stato amplificato con PCR dal plasmide pcDNA3-PB1 utilizzando i *primers* pcDNA-PB1/FOR e pcDNA-PB1/REV, contenenti rispettivamente i siti di restrizione per BamHI e BglII. *PB1* è stata clonata nel vettore Zero BLUNT TOPO utilizzando lo Zero BLUNT TOPO PCR Cloning Kit. Successivamente, utilizzando gli enzimi di restrizione BamHI e BglII sono stati tagliati sia pcDNA3.1-Nectin1-EGFP (1-157) (questo taglio produce un frammento di 1300 bp contenente Nectin 1 e un frammento di circa 5400 bp, corrispondente al resto del plasmide) sia il plasmide ZeroBLUNT TOPO-PB1 (questo taglio produce un frammento di 2200 bp contenente PB1 e un frammento di circa 3500 bp, corrispondente al resto del plasmide). Dopo aver caricato in gel di agarosio i prodotti di restrizione e purificato i frammenti di interesse, ne abbiamo fatto la ligazione. In seguito abbiamo verificato l'avvenuto clonaggio sia attraverso analisi di restrizione (utilizzando gli enzimi BamHI e BglII) e sia con sequenziamento utilizzando i primers pcDNAseq/FOR e pcDNAseq/REV che permettono il sequenziamento delle regioni di congiunzione tra il plasmide e il frammento di DNA clonato. Abbiamo quindi ottenuto il plasmide pcDNA-PB1-EGFP (1-157) (di circa 8200 bp).

Per creare il plasmide pcDNA3.1-PA-EGFP (158-239), il gene codificante PA è stato amplificato con PCR dal plasmide pcDNA3-PA utilizzando i *primers* pcDNAPA/FOR e pcDNAPA/REV, contenenti rispettivamente i siti di restrizione per HindIII e BglII. La sequenza codificante PA è stata clonata nel vettore Zero BLUNT TOPO utilizzando lo Zero BLUNT TOPO PCR Cloning Kit. Successivamente, utilizzando gli enzimi di restrizione HindIII e BglII, sono stati tagliati sia pcDNA3.1-gD-EGFP (158-239) sia ZeroBLUNT TOPO-PA. Dopo aver caricato in gel di agarosio i prodotti di restrizione e purificato i frammenti di interesse, ne abbiamo fatto la ligazione. In seguito abbiamo verificato l'avvenuto clonaggio sia attraverso analisi di restrizione (utilizzando gli enzimi HindIII e BglII) e sia con sequenziamento utilizzando i *primers* pcDNA/FOR e pcDNA/REV che permettono il sequenziamento delle regioni di giunzione tra il plasmide e il frammento di DNA clonato. Abbiamo quindi ottenuto il plasmide pcDNA3.1-PA-EGFP (158-239) (di circa 8000 bp).

Per creare il plasmide pcDNA3.1-PB2-EGFP (158-239), il gene codificante PB2 è stato amplificato con PCR dal plasmide pcDNA3-PB2 utilizzando i *primers* pcDNAPB2/FOR e pcDNAPB2/REV, contenenti rispettivamente i siti di restrizione per HindIII e BglII. La sequenza codificante PB2 è stata clonata in Zero BLUNT TOPO utilizzando Zero BLUNT TOPO PCR Cloning Kit. Successivamente, utilizzando gli enzimi di restrizione HindIII e BglII, sono stati tagliati sia pcDNA3.1-gD-EGFP (158-239) sia ZeroBLUNT TOPO-PA. Dopo aver caricato in gel di agarosio i prodotti di restrizione e purificato i frammenti di interesse, ne abbiamo fatto la ligazione. In seguito abbiamo verificato l'avvenuto clonaggio sia attraverso analisi di restrizione (utilizzando gli enzimi HindIII e BglII) e sia con sequenziamento utilizzando i *primers* pcDNA/FOR e pcDNA/REV che permettono il sequenziamento delle regioni di giunzione tra il plasmide e il frammento di DNA clonato. Abbiamo quindi ottenuto il plasmide pcDNA3.1-PB2-EGFP (158-239) (di circa 8300 bp).

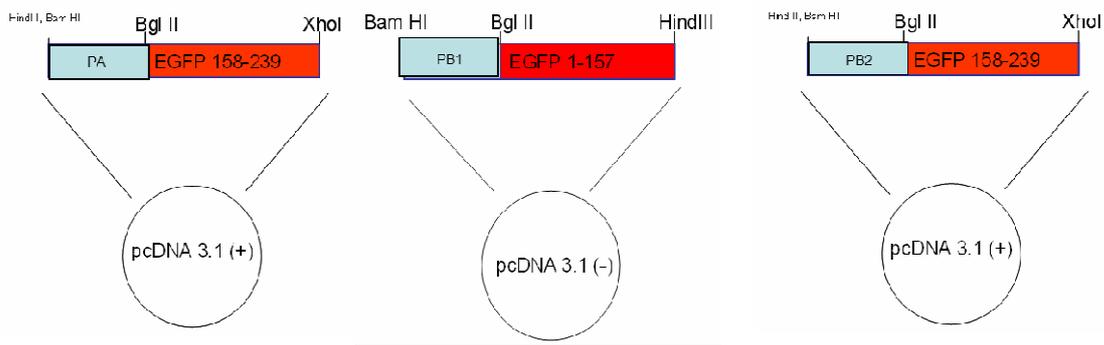


Figura 28. Clonaggio di PA e PB2 in pcDNA-EGFP (158-239) e di PB1 in pcDNA-EGFP (1-157).

4.6.b Messa a punto del saggio di BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)

Per valutare l'efficienza di questo saggio sono stati inizialmente effettuati saggi di BiFC utilizzando i costrutti sopra descritti. Cellule HEK 293T sono state co-trasfettate con i plasmidi pcDNA3.1-PA-eGFP (158-239), pcDNA3.1-PB1-eGFP (1-157) e pcDNA3.1-PB2-eGFP (158-239). Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state analizzate mediante microscopia confocale per valutare la complementazione e quindi l'espressione della eGFP. Come si può osservare dalla **Figura 29** l'efficienza di complementazione della eGFP ottenuta con i costrutti da noi creati è molto bassa.

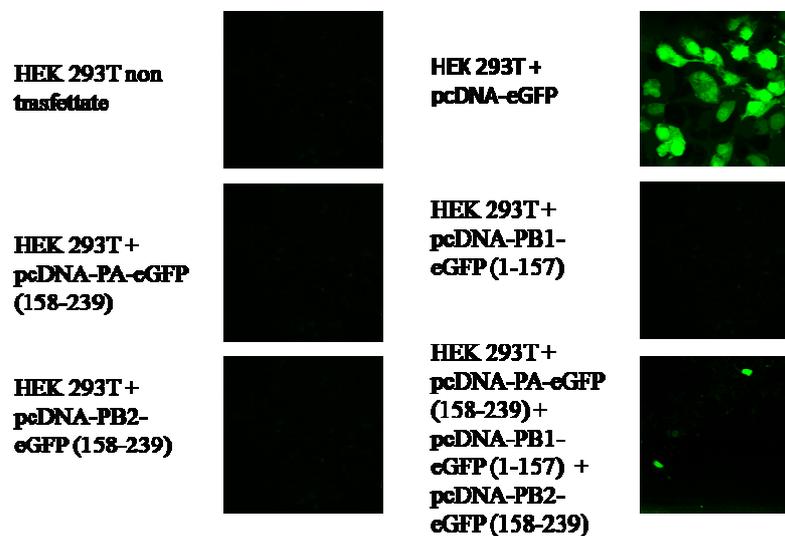


Figura 29. Co-trasfezione di cellule HEK 293T con i plasmidi pcDNA3.1-PA-EGFP (158-239), pcDNA3.1-PB1-EGFP (1-157) e pcDNA3.1-PB2-EGFP (158-239) o pcDNA-eGFP come controllo.

Questo saggio non è in grado di rilevare l'interazione tra le proteine della polimerasi del virus dell'influenza, probabilmente perché è necessario che sia presente qualche altro fattore virale, ad esempio NP. Per questo motivo, si è deciso di non utilizzarlo, ma di procedere con la caratterizzazione dei composti attivi identificati in ELISA mediante altri tipi di saggio.

4.7 Saggio *His-pulldown* con IVT PB1 e 6His-PA (239-716) purificata

E' stato condotto, inoltre, un saggio di *His-pulldown* per valutare se i composti risultati attivi in ELISA fossero in grado di inibire anche l'interazione tra 6His-PA (239-716) e l'intera proteina PB1 invece che solo il frammento 1-25 come in ELISA.

Per questi saggi è stata utilizzata la proteina di fusione 6His-PA (239-716) purificata (vedi Materiali, paragrafo 3.9.a) e l'intera proteina PB1 espressa *in vitro* (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.12) e marcata con [³⁵S] Met. La proteina 6His-PA (239-716) è stata incubata con PB1 in presenza del peptide Tat-PB1₁₋₁₅ o dei composti 5, 10, 12 o 31 attivi in ELISA. Come controllo negativo è stato incluso il composto 3 che non interferisce con l'interazione PA/PB1 in ELISA.

La miscela di reazione è stata successivamente caricata in colonne contenenti la resina Ni-NTA. Le colonne sono state quindi sottoposte a lavaggi e le proteine legate sono state eluite con un tampone di eluizione contenente imidazolo.

Le frazioni di eluizione sono state analizzate in gel di poliacrilammide e successiva autoradiografia.

Come si può osservare dalla **Figura 30**, il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ è in grado di inibire l'interazione PA/PB1 in quanto la banda corrispondente alla proteina PB1 (83 kDa) è meno intensa rispetto a quella del controllo non trattato (S).

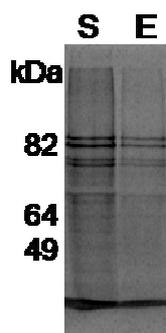


Figura 30. His-pulldown in presenza del peptide Tat-PB1₁₋₁₅. S: *starting sample*; E: campione eluito.

Successivamente, dato che il saggio è in grado di rilevare l'inibizione dell'interazione PA/PB1, sono stati saggiati i composti maggiormente attivi in ELISA. Dalla **Figura 31** si può osservare come il composto 3, il controllo negativo, non influisce sul legame PA/PB1, mentre i composti 5, 10, 12 e 31 provocano una diminuzione del legame PA/PB1, rispetto al campione non trattato con i composti (*control*), a conferma dei dati ottenuti in ELISA.

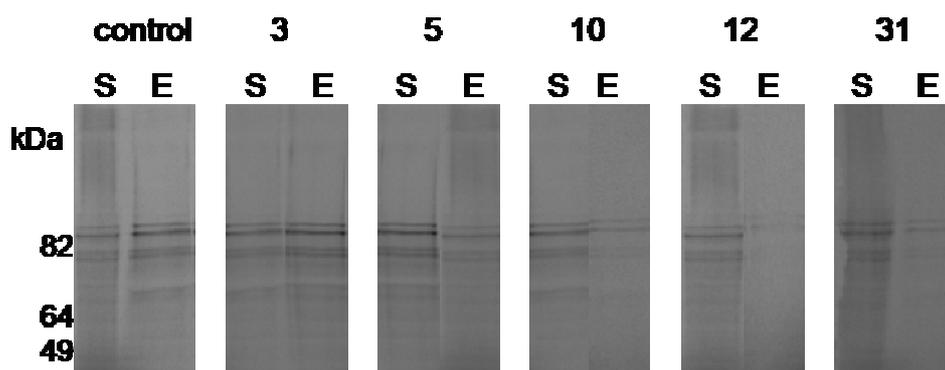


Figura 31. His-pull-down con i composti 3, 5, 10, 12 e 31. S: starting sample; E: campione eluito.

4.8 Saggi di citotossicità in cellule HEK 293T e MDCK

Per determinare se i composti fossero citotossici sulle cellule HEK 293T e MDCK è stato condotto un saggio di citotossicità che consente di ottenere una misura quantitativa delle cellule vive e metabolicamente attive. Questo metodo si basa su un saggio enzimatico colorimetrico che utilizza come substrato il composto MTT. Questo composto è un substrato cromogenico delle deidrogenasi mitocondriali. Effettuando una lettura a 550 nm (lunghezza d'onda di assorbimento del prodotto dell'MTT) vengono misurati i valori di assorbanza relativi alle cellule trattate con ciascuna concentrazione di composto. Questi valori vengono riportati in grafico in relazione alle concentrazioni di composto saggiate. Elaborando i dati è possibile determinare i valori di CC_{50} dei diversi composti sulle linee cellulari.

In **Tabella 6** sono riportati i valori di CC_{50} ottenuti per ciascun composto sulle due linee cellulari (i valori riportati sono la media di 3 esperimenti indipendenti).

Tabella 6. Citotossicità dei composti in cellule HEK 293T e MDCK. Il valore di CC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che causa citotossicità sul 50% delle cellule (misurato con metodo MTT).

Compound	CC ₅₀ 293T	CC ₅₀ MDCK	Compound	CC ₅₀ 293T	CC ₅₀ MDCK
1	90 µM	> 250 µM	17	12 µM	85 µM
2	110 µM	230 µM	18	225 µM	> 250 µM
3	> 250 µM	> 250 µM	19	100 µM	> 250 µM
4	25 µM	90 µM	20	20 µM	150 µM
5	> 250 µM	> 250 µM	21	> 250 µM	> 250 µM
6	160 µM	205 µM	22	30 µM	> 250 µM
7	> 250 µM	> 250 µM	23	> 250 µM	> 250 µM
8	> 250 µM	> 250 µM	24	100 µM	200 µM
9	> 250 µM	> 250 µM	25	55 µM	> 250 µM
10	> 250 µM	> 250 µM	26	40 µM	70 µM
11	210 µM	> 250 µM	27	> 250 µM	> 250 µM
12	2 µM	12.5 µM	28	100 µM	130 µM
13	35 µM	> 100 µM	29	70 µM	> 250 µM
14	50 µM	> 250 µM	30	> 250 µM	> 250 µM
15	220 µM	140 µM	31	> 250 µM	> 250 µM
16	200 µM	> 250 µM	32	35 µM	40 µM
			Tat PB1 ₁₋₁₅ peptide	190 µM	180 µM

Alcuni dei composti risultati attivi in ELISA (5, 8, 10, 18, 31) non sono citotossici in nessuna delle due linee cellulari infatti i valori di CC₅₀ ottenuti sono elevati; il composto 12 invece, che in ELISA sembrava essere il più promettente, è citotossico (CC₅₀ 2 e 12,5 µM). I composti citotossici sono stati esclusi da analisi successive.

4.9 Identificazione di composti analoghi

Sulla base di questi primi dati sono stati condotti degli studi di SAR (*Structure-Activity Relationship*) e sintetizzati in collaborazione con il Prof. G. Cruciani (Università di Perugia) una serie di composti analoghi ai composti 1, 4, 5, 10 e 12 per cercare di aumentarne l'attività antivirale e/o diminuirne la citotossicità (**Tabella 7**).

Tabella 7. Composti ottenuti mediante studi di SAR.

Composto	Composto analogo	Composto	Composto analogo	Composto	Composto analogo
33	5	44	4	55	34
34	5	45	4	56	1
35	5	46	4	57	1
36	4	47	5	58	1
37	4	48	5	59	1
38	4	49	5	60	1
39	4	50	34	61	1
40	12	51	34	62	1
41	5	52	34	63	1
42	12	53	34	64	34
43	10	54	34		

4.10 ELISA con i composti analoghi dei composti attivi

I composti di nuova sintesi sono stati saggiati, come i precedenti, in ELISA a due diverse concentrazioni (50 e 100 μ M). Quello che è emerso è che 8 fra questi composti sono in grado di causare una diminuzione dei valori di assorbanza e quindi di inibire l'interazione PA/PB1 (Tabella 8).

Tabella 8. Attività dei composti in ELISA: + attivo, - non attivo, +/- debolmente attivo.

Composto	Composto analogo	Attività	Composto	Composto analogo	Attività	Composto	Composto analogo	Attività
33	5	+	44	4	+	55	34	-
34	5	+	45	4	-	56	1	-
35	5	-	46	4	-	57	1	+
36	4	-	47	5	+/-	58	1	-
37	4	-	48	5	+/-	59	1	-
38	4	-	49	5	-	60	1	-
39	4	-	50	34	-	61	1	-
40	12	+/-	51	34	-	62	1	-
41	5	-	52	34	-	63	1	-
42	12	-	53	34	-	64	34	+
43	10	-	54	34	-			

Gli 8 composti risultati attivi in questo primo *screening* sono stati successivamente sottoposti a un'analisi mirata a valutare la dose-dipendenza dell'effetto inibitorio. E' stato condotto un ELISA analogo in cui i composti sono stati aggiunti a diverse concentrazioni. I valori di assorbanza ottenuti sono stati riportati in valore percentuale considerando il controllo non trattato con i composti come 100% e poi utilizzati per costruire un grafico che mette in relazione l'attività inibitoria espressa in questo valore percentuale (valore percentuale rispetto al controllo non trattato) con la concentrazione di composto utilizzato. In **Tabella 9** sono riportati i valori di IC₅₀ per tali composti e il peptide di riferimento ottenuti dalla media di 3 esperimenti indipendenti.

Tabella 9. Il valore di IC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto che riduce l'interazione PA/PB1 del 50% ed è stato determinato con ELISA.

Composto	IC ₅₀ (μM)
33	35 μM
34	30 μM
40	98 μM
44	5 μM
47	120 μM
48	135 μM
57	25 μM
64	9 μM
Tat PB1 ₁₋₁₅ peptide (positive control)	35 μM

Come si può osservare dalla **Tabella 9** i composti 33, 34, 44, 57 e 64 inibiscono l'interazione PA/PB1 in maniera dose-dipendente con valori di IC₅₀ comparabili a quello del peptide di controllo. I composti 40, 47 e 48, invece, inibiscono l'interazione PA/PB1 in maniera dose-dipendente con valori di IC₅₀ maggiori rispetto a quello del controllo positivo.

4.11 Saggi di citotossicità in cellule HEK 293T e MDCK con i composti analoghi

Per determinare inoltre se i composti di nuova sintesi fossero citotossici sulle cellule HEK 293T e MDCK sono stati effettuati saggi di citotossicità in maniera analoga che per i precedenti composti. I valori di assorbanza ottenuti sono stati riportati in grafico in relazione alle concentrazioni di composto saggiate. Elaborando i dati sono stati determinati i valori di CC₅₀ dei diversi composti sulle due linee cellulari. Per quanto riguarda i composti 34, 40, 44, 47, risultati attivi in ELISA, non sono citotossici in nessuna delle due linee cellulari, infatti i valori di CC₅₀ ottenuti sono >250 μM; invece i composti 33 e 48 sono citotossici e quindi sono stati esclusi dalle analisi successive (**Tabella 10**).

Tabella 10. Citotossicità dei composti in cellule HEK 293T e MDCK. Il valore di CC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che causa citotossicità sul 50% delle cellule, determinato con metodo MTT. I dati riportati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Composto	CC_{50} HEK 293T	CC_{50} MDCK	Composto	CC_{50} HEK 293T	CC_{50} MDCK
33	18 μ M	12 μ M	49	45 μ M	> 250 μ M
34	> 250 μ M	> 250 μ M	50	155 μ M	> 250 μ M
35	20 μ M	30 μ M	51	30 μ M	60 μ M
36	35 μ M	55 μ M	52	> 250 μ M	> 250 μ M
37	200 μ M	> 250 μ M	53	> 250 μ M	> 250 μ M
38	55 μ M	90 μ M	54	> 250 μ M	> 250 μ M
39	150 μ M	250 μ M	55	> 250 μ M	95 μ M
40	> 250 μ M	> 250 μ M	56	>250 μ M	110 μ M
41	> 250 μ M	> 250 μ M	57	200 μ M	>250 μ M
42	> 250 μ M	> 250 μ M	58	>250 μ M	>250 μ M
43	> 250 μ M	> 250 μ M	59	>250 μ M	>250 μ M
44	> 250 μ M	> 250 μ M	60	>250 μ M	>250 μ M
45	240 μ M	> 250 μ M	61	>250 μ M	>250 μ M
46	25 μ M	70 μ M	62	>250 μ M	>250 μ M
47	> 250 μ M	> 250 μ M	63	>250 μ M	>250 μ M
48	40 μ M	50 μ M	64	>250 μ M	>250 μ M

4.12 Saggi di citotossicità in cellule A549 e HSB-2

E' stata inoltre valutata la citotossicità dei composti maggiormente promettenti anche su cellule A549 e HSB-2 mediante saggio MTT (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.19). Come si può osservare nella **Tabella 11**, i composti non sono citotossici in nessuna delle due linee cellulari, infatti i valori di CC_{50} ottenuti sono > 250 μ M. Il composto 1 mostra citotossicità se aggiunto ad alte concentrazioni (CC_{50} 90 μ M) in una delle due linee cellulari.

Tabella 11. Citotossicità dei composti in cellule A549 e HSB-2. Il valore di CC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che causa citotossicità sul 50% delle cellule, determinato con metodo MTT. I dati riportati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Composto	CC_{50} A549	CC_{50} HSB2
1	>250 μ M	90 μ M
3	>250 μ M	>250 μ M
5	>250 μ M	>250 μ M
34	>250 μ M	>250 μ M
44	250 μ M	>250 μ M

4.13 Minireplicon assay con plasmidi esponenti proteine del virus dell'influenza A

Dopo aver identificato i composti in grado di inibire l'interazione PA/PB1 *in vitro* si è voluto valutare la loro capacità di inibire l'attività polimerasica virale utilizzando un sistema in cui si mima la trascrizione virale e se ne valuta l'efficienza. Il saggio di *minireplicon* prevede, infatti, che cellule HEK 293T vengono trasfettate con quattro diversi plasmidi esponenti le proteine PA, PB1, PB2 e NP e un quinto plasmide contenente le estremità del segmento genomico 8 dell'influenza A all'interno delle quali si trova il gene *reporter* della luciferasi (**Figura 32**). Se il complesso replicativo si assembla in maniera corretta ed è attivo esso è in grado di trascrivere il gene *reporter*. La capacità di replicazione viene misurata attraverso l'espressione di questo gene mediante lettura della luminescenza emessa.

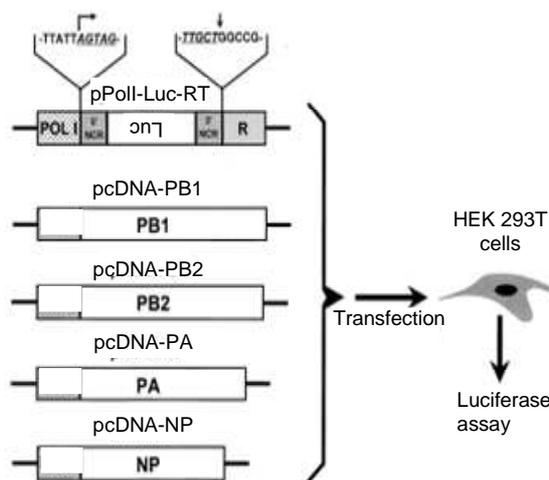


Figura 32. Rappresentazione schematica del saggio di *minireplicon* (da Pleschka *et al.*, 1996).

I composti attivi in ELISA e non citotossici sono stati saggiati inizialmente a una sola concentrazione (50 μ M) in modo da escludere dalle analisi successive i composti totalmente non attivi, ma non quelli debolmente attivi. Il composto 3 è stato incluso nell'analisi come controllo negativo in quanto non inibisce l'interazione PA/PB1 in ELISA. Quello che è emerso è che 8 fra questi composti sono in grado di causare una diminuzione di luminescenza comparabile a quella osservata in presenza del peptide di controllo (**Figura 33**). Il composto 3 non causa diminuzione di espressione del gene *reporter* confermando la validità del saggio ELISA in quanto i dati ottenuti nei due saggi concordano tra di loro.

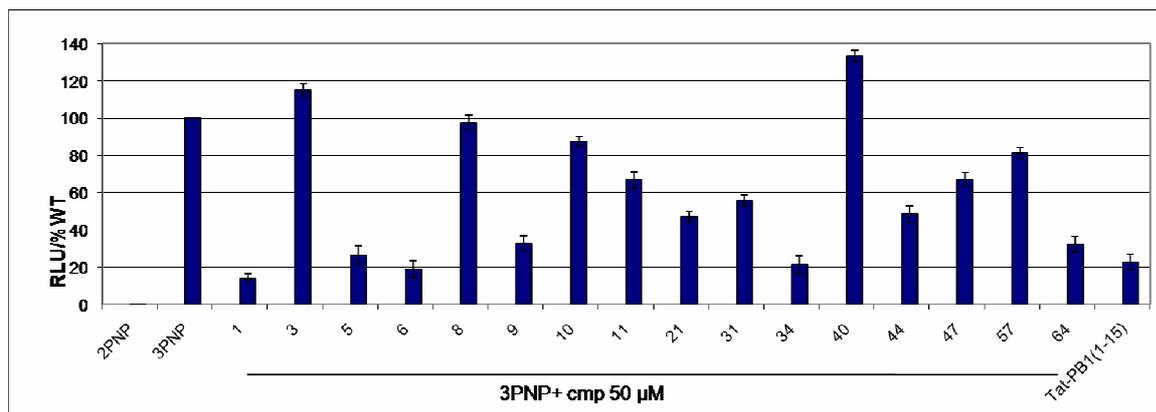


Figura 33. Effetto dei composti sulla replicazione virale del virus dell'influenza A in saggi di minireplicon. RLU: *Relative Light Units* corrispondenti alla luminescenza emessa da cellule trasfettate con il costrutto plasmidico contenente il gene *reporter* della luciferasi; RLU/%WT: RLU espresse in questo valore percentuale (valore percentuale rispetto al controllo non trattato); 2PNP: cellule trasfettate con pcDNA-PA, pcDNA-PB1, pcDNA-NP, pPolI-Luc; 3PNP: cellule trasfettate con pcDNA-PA, pcDNA-PB1, pcDNA-PB2, pcDNA-NP, pPolI-Luc. I valori riportati sono stati ottenuti dalle media di 3 esperimenti indipendenti.

I composti risultati attivi in questo primo *screening* e cioè quelli attivi a 50 µM sono stati successivamente sottoposti a un'analisi mirata a valutare la dose-dipendenza dell'effetto inibitorio. Il saggio è stato condotto nelle stesse condizioni aggiungendo i composti a tre diverse concentrazioni 25, 50 e 100 µM. È stato incluso il composto 3 come controllo negativo e come controllo positivo il peptide PB1₁₋₁₅ fuso al dominio di traslocazione della proteina Tat (aa 47-57) del virus dell'immunodeficienza umana (HIV) per permetterne il trasporto intracellulare.

Ciascun valore è stato normalizzato in base al numero di cellule e all'efficienza di trasfezione. Per fare questo ogni campione è stato analizzato mediante WB valutandone l'espressione del gene cellulare tubulina e del gene virale NP (**Figura 34**).

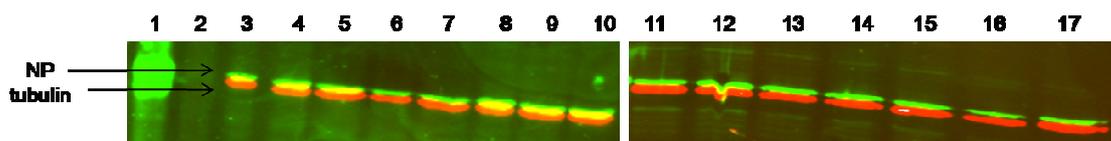


Figura 34. 1: Cellule infettate; 2: cellule non infettate; 3: 2PNP; 4: 3PNP; 5-17: 3PNP+composti (rispettivamente DMSO, 1, 3, 5, 6, 11, 21, 31, 34, 44, 47, 64, Tat-PB1₁₋₁₅).

Come si può osservare dalla **Figura 34** l'espressione di entrambi i geni è comparabile tra il campione di controllo (3PNP) e i campioni trattati con i composti. Questo dimostra come i composti non influiscano sull'espressione dei geni virali e cellulari. Ciascuna banda è stata analizzata mediante il programma Image J (NIH) determinandone l'area. Tale valore è stato utilizzato per normalizzare il valore di luminescenza ottenuto.

I dati ottenuti in seguito a normalizzazione sono stati riportati in valore percentuale considerando il controllo non trattato con i composti (controllo denominato 3PNP) come 100% e poi utilizzati per costruire un grafico che mette in relazione le unità di luce relative (*Relative Light Units*: RLU) espresse in questo valore percentuale (valore percentuale rispetto al controllo non trattato) con la concentrazione di composto utilizzato (**Figura 35**).

I dati riportati in **Figura 35** e in **Tabella 12** sono stati ottenuti dalla media di tre esperimenti indipendenti normalizzati come sopra descritto. In **Tabella 12** sono riportati i valori di EC_{50} per i composti e il peptide di riferimento.

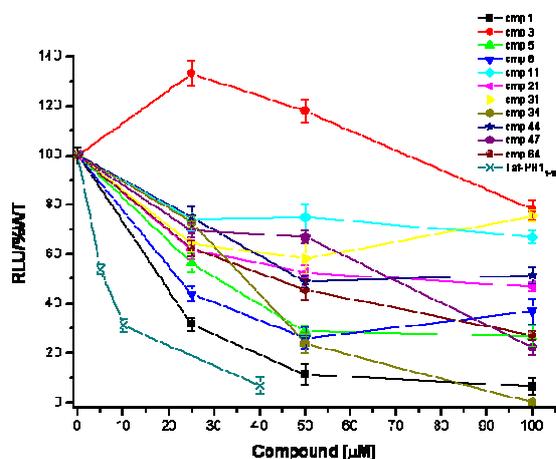


Figura 35. RLU: *Relative Light Units* corrispondenti alla luminescenza emessa da cellule trasfettate con il costrutto plasmidico contenente il gene *reporter* della luciferasi; RLU/% WT: RLU espresse in questo valore percentuale (valore percentuale rispetto al controllo non trattato).

Tabella 12. Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che riduce la replicazione virale del 50% ed è stato determinato con saggio di *minireplicon*.

Compound	EC_{50} (μ M)
1	18
3	>100
5	32
6	23
11	>100
21	85
31	>100
34	37
44	100
47	70
64	42
Tat-PB1 ₁₋₁₅	5.8

Come si può osservare dalla **Figura 35** e dalla **Tabella 12** i composti 1, 5, 6, 34 e 64 diminuiscono l'espressione del gene *reporter* in maniera dose-dipendente con valori di EC_{50} comparabili con quelli del peptide di controllo. Il composto 3 non causa diminuzione dell'espressione del gene *reporter* anche ad elevate concentrazioni (100 μ M).

4.14 *Minireplicon assay* con plasmidi esprimenti proteine del virus dell'influenza B

Dato che la regione di interazione PA/PB1 è conservata tra i diversi ceppi di influenza A, ma anche tra influenza A e B, si è voluto determinare la capacità dei composti di inibire l'attività polimerasica virale del virus dell'influenza B tramite saggio di *minireplicon* trasfettando cellule HEK 293T con plasmidi esprimenti le proteine PA, PB1, PB2 e NP del virus dell'influenza B e un plasmide contenente le estremità del segmento genomico 8 dell'influenza B all'interno delle quali si trova il gene *reporter* della GFP. L'espressione del gene *reporter* è stata valutata in maniera qualitativa mediante osservazione al microscopio a fluorescenza.

I composti maggiormente attivi (composti 5 e 34) e il controllo negativo (composto 3) sono stati saggiati a una sola concentrazione (50 µM).

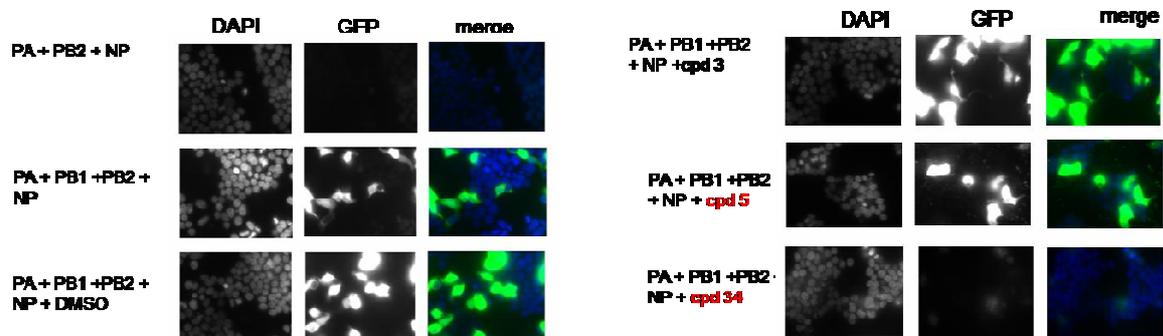


Figura 36. Effetto dei composti sull'attività polimerasica virale del virus dell'influenza B in saggi di *minireplicon*. PA: cellule trasfettate con pCIP-PA; PB1: cellule trasfettate con pCIP-PB1; PB2: cellule trasfettate con pCIP-PB2; NP: cellule trasfettate con pCIP-NP.

Come si può osservare in **Figura 36** il composto 5 non causa diminuzione dell'espressione del gene *reporter* GFP, come il controllo negativo il composto 3. Il composto 34, invece, provoca una inibizione marcata dell'espressione della GFP. Non potendo quantificare tale espressione questo dato ha solo valore qualitativo, conferma in ogni caso che il composto 34 inibisce l'attività polimerasica del virus dell'influenza in maniera indipendente dalla specie di influenza come ci si aspettava.

4.15 Produzione di *stocks* virali di A/PR/8/34, A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06, A/PARMA/24/09 e B/Malaysia/2506/4 e determinazione del loro titolo

Sono stati quindi prodotti *stocks* virali di A/PR/8/34, A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06, A/PARMA/24/09 e B/Malaysia/2506/4 infettando cellule MDCK per un'ora a 37°C e raccogliendo il virus dopo circa 48 ore. Per valutare il titolo del virus è stato utilizzato il saggio delle placche (PA: *plaque assay*; vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.20.a).

4.16 Attività antivirale dei composti

4.16.a Effetto antivirale dei composti contro A/PR/8/34

Dopo aver valutato la capacità dei composti di inibire l'attività della RNA polimerasi virale in un contesto cellulare e aver determinato che alcuni di questi sono significativamente attivi si è voluta saggiare la loro attività antivirale in un saggio di riduzione delle placche (PRA: *Plaque Reduction Assay*) utilizzando il virus dell'influenza A/PR/8/34.

Per studiare l'attività antivirale dei composti nei confronti del virus dell'influenza A sono state utilizzate cellule MDCK infettate con il virus A/PR/8/34 a MOI 0,005 e trattate con una sola concentrazione di composto (50 μ M) o RBV per confronto.

Per controllo alcuni campioni sono stati infettati, ma non trattati con i composti, in alcuni di questi è stato aggiunto DMSO alla stessa concentrazione, il solvente in cui sono solubilizzati i composti, per escludere ci potesse essere un effetto inibitorio da parte del DMSO.

La **Figura 37** mostra la formazione di placche espressa in valore percentuale rispetto al controllo non trattato (NT), solo alcuni composti inibiscono la formazione delle placche in maniera uguale o maggiore rispetto al peptide di controllo (cmp 1, 5, 34, 42, 43, 52, 54).

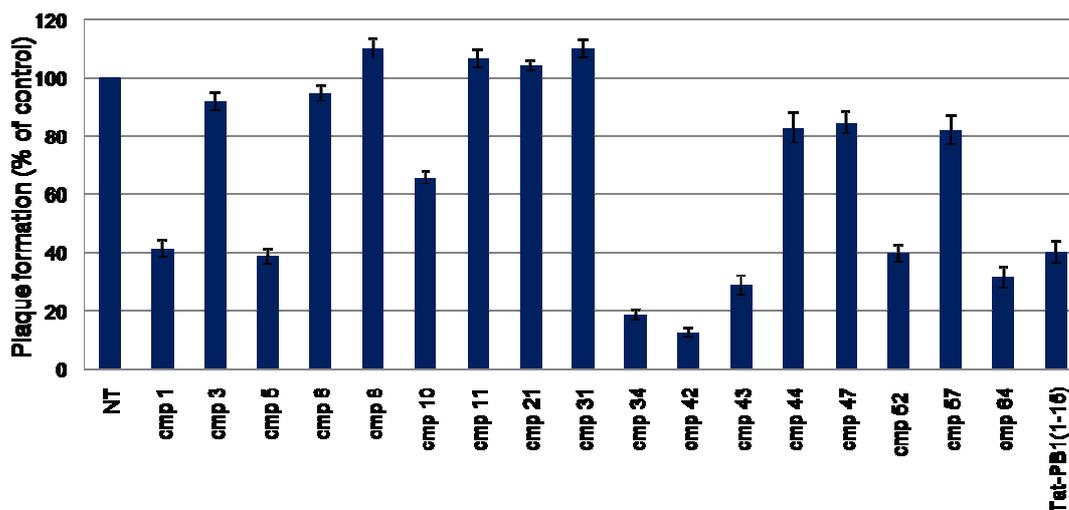


Figura 37. Effetto dei composti sulla replicazione virale del virus A/PR/8/34 valutato mediante PRA. I valori riportati sono stati ottenuti dalla media di 3 esperimenti indipendenti.

I composti risultati attivi in questo primo *screening* e cioè quelli attivi a 50 μ M sono stati successivamente sottoposti a un'analisi mirata a valutare la dose-dipendenza dell'effetto inibitorio. Il saggio è stato condotto nelle stesse condizioni aggiungendo i composti a tre diverse concentrazioni (25, 50 e 100 μ M). È stato incluso il composto 3 come controllo negativo, il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ come controllo positivo e la RBV come composto di riferimento.

I dati ottenuti sono stati riportati in valore percentuale considerando il controllo non trattato con i composti (NT) come 100% e poi utilizzati per costruire un grafico che mette in relazione il numero delle placche virali formatesi espresso in questo valore percentuale (valore percentuale rispetto al controllo non trattato) con la concentrazione di composto utilizzato (**Figura 38**).

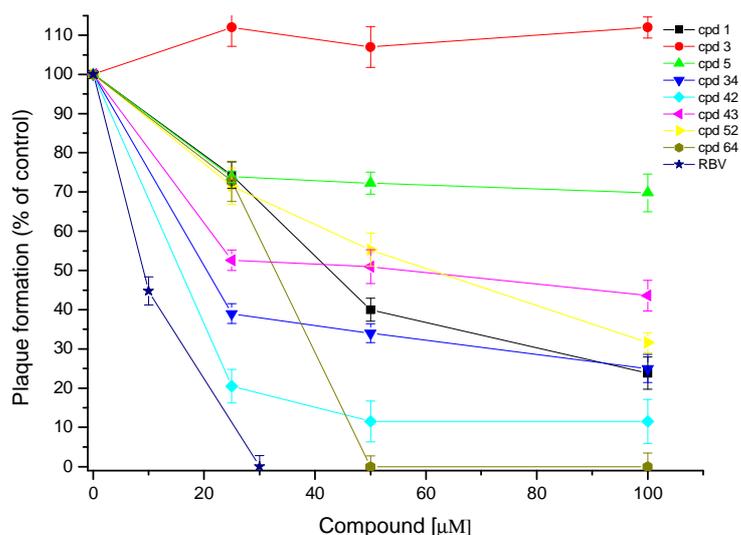


Figura 38. Caratterizzazione dell'attività antivirale dei composti in esame, e RBV come controllo, contro A/PR/8/34. I valori riportati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Elaborando i dati riportati in **Figura 38** è stato possibile determinare il valore di EC_{50} dei composti e della RBV utilizzata come controllo. E' stato osservato che la replicazione di A/PR/8/34 viene inibita dal composto di riferimento RBV con un valore di EC_{50} pari a 8,5 μ M. Questo valore è simile al valore di EC_{50} 22,5 μ M riportato in letteratura (Sidwell *et al.*, 2005); per quanto riguarda i composti è stato determinato invece un valore di EC_{50} pari a 47 μ M per il composto 1, 15 μ M per il composto 34, 48 μ M per il composto 43, 53 μ M per il composto 52 e 33 μ M per il composto 64 (**Tabella 13**). Gli altri composti hanno valori di $EC_{50} > 100 \mu$ M e sono stati considerati quindi inattivi (**Tabella 13**).

Tabella 13. Attività antivirale di RBV e dei composti in esame in cellule infettate con A/PR/8/34. Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione di composto richiesta per ridurre del 50% la replicazione virale determinato mediante PRA.

Compound	EC_{50} (μ M)
1	42
3	>100
5	>100
34	15
42	>100
43	55
52	62
64	33
RBV	8.5

Il composto 34 inibisce la replicazione virale di A/PR/8/34 con un valore di EC₅₀ comparabile a quello della ribavirina (22,5 µM da Sidwell *et al.*, 2005) e quelli dei composti attualmente utilizzati in terapia oseltamivir e zanamivir (rispettivamente ~ 3 µM e 1,8-4 µM, da Triana *et al.*, 2009).

4.16.b Effetto antivirale dei composti contro il virus dell'influenza B B/Malaysia/2506/4

Dopo aver valutato la capacità dei composti di inibire la replicazione virale del virus A/PR/8/34 e aver determinato che alcuni di questi sono significativamente attivi si è voluta saggiare la loro attività antivirale anche contro il virus dell'influenza B. E' stato utilizzato a tale scopo un ceppo clinico di influenza: il virus B/Malaysia/2506/4.

Cellule MDCK sono state infettate con il virus B/Malaysia/2506/4 a MOI 0,005 e trattate con diverse concentrazioni di composto (25, 50 e 100 µM) o RBV per confronto.

Per controllo, alcuni campioni sono stati infettati, ma non trattati con i composti, e in alcuni di questi è stato aggiunto DMSO, il solvente in cui sono solubilizzati i composti per escludere che l'effetto di essi dipendesse dal solvente. E' stato incluso il composto 3 come controllo negativo, il peptide Tat-PB1₁₋₁₅ come controllo positivo e la RBV come composto di riferimento.

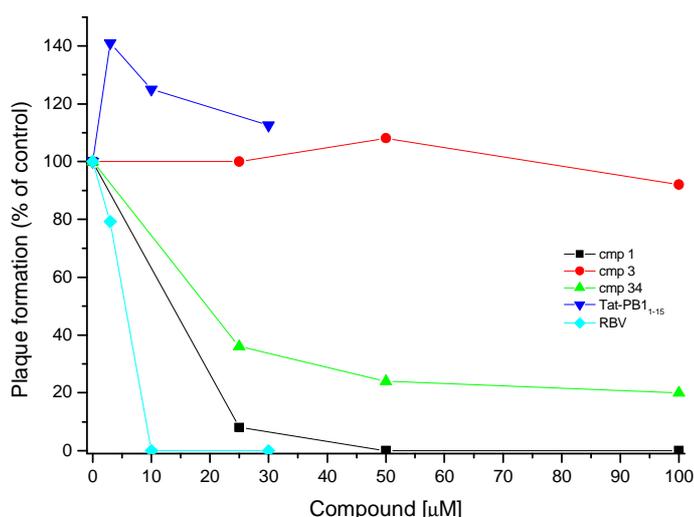


Figura 39. Caratterizzazione dell'attività antivirale dei composti in esame, e RBV come controllo, contro B/Malaysia/2506/4. I valori riportati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Elaborando i dati riportati in **Figura 39** è stato possibile determinare il valore di EC₅₀ dei composti e della RBV utilizzata come controllo. E' stato osservato che la replicazione del virus B/Malaysia/2506/4 viene inibita dal composto di riferimento RBV con un valore di EC₅₀ pari a 5 µM. Questo valore è simile al valore di EC₅₀ 7,4 µM riportato in letteratura (Sidwell *et al.*, 2005); per quanto riguarda i composti in esame è stato determinato un valore di EC₅₀ pari a 13 µM per il composto 1 e 20 µM per il composto 34 (**Tabella 14**). Il composto 3, il controllo negativo, ha un valore di EC₅₀ > 100 µM, come il peptide Tat-PB1₁₋₁₅. Questo peptide non è attivo contro il virus dell'influenza B poiché è stato dimostrato che il peptide in grado di inibire l'interazione PA/PB1 delle subunità del virus

dell'influenza B differisce di un solo residuo, ma cruciale, rispetto al peptide che inibisce l'interazione nel virus dell'influenza A (Wunderlich *et al.*, 2009).

Tabella 14. Attività antivirale di RBV e dei composti in esame in cellule infettate con B/Malaysia/2506/4. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto richiesta per ridurre del 50% la replicazione virale determinato mediante PRA.

Cmp	EC₅₀ (µM)
Cmp 1	13 µM
Cmp 3	> 100 µM
Cmp 34	20 µM
Tat-PB1 ₁₋₁₅	> 100 µM
RBV	5 µM

I composti 1 e 34 mostrano un'attività antivirale significativa anche contro il virus dell'influenza B.

4.16.c Effetto antivirale dei composti contro i ceppi clinici A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06 e A/PARMA/24/09

Per caratterizzare ulteriormente l'attività antivirale dei composti essi sono stati saggiati anche contro diversi ceppi clinici dell'influenza A isolati da pazienti: il virus H3N2 A/WSN/67/05, il virus H1N1 A/Solomon Island/3/06 e il virus H1N1 A/PARMA/24/09 resistente al Tamiflu.

Cellule MDCK sono state infettate con i virus A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06 o A/PARMA/24/09 a MOI 0,005 e trattate diverse concentrazioni dei composti (25, 50 e 100 µM) o RBV per confronto.

Per controllo alcuni campioni sono stati infettati, ma non trattati con i composti, e in alcuni di questi è stato aggiunto DMSO, il solvente in cui sono solubilizzati i composti per escludere che l'effetto di essi dipendesse dal solvente. E' stato incluso il composto 3 come controllo negativo e la RBV come composto di riferimento.

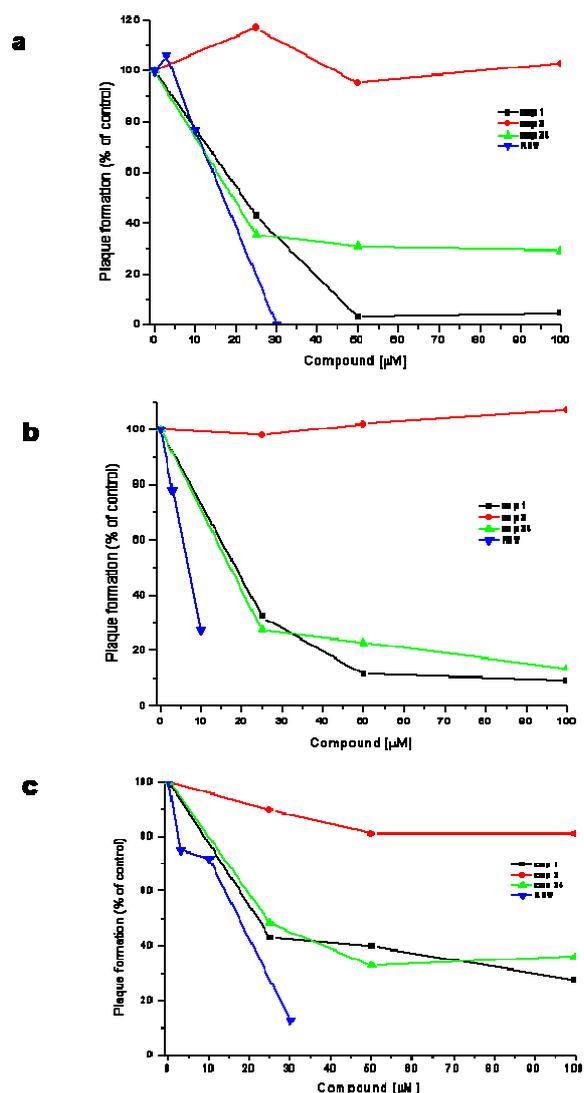


Figura 40. Caratterizzazione dell'attività antivirale dei composti, in esame e RBV come controllo, contro ceppi clinici H3N2 A/WSN/67/05 (a), H1N1 A/Solomon Island/3/06 (b) e H1N1 A/PARMA/24/09 (c). I valori riportati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Elaborando i dati riportati in **Figura 40** è stato possibile determinare il valore di EC_{50} dei composti e della RBV utilizzata come controllo. E' stato osservato che la replicazione del virus A/WSN/67/05 viene inibita dal composto di riferimento RBV con un valore di EC_{50} pari a 17 μM ; per quanto riguarda i composti è stato determinato invece un valore di EC_{50} pari a 22,5 μM per il composto 1 e 20 μM per il composto 34 (**Tabella 15**). Il composto 3, il controllo negativo, ha un valore di $EC_{50} > 100 \mu M$. I valori di EC_{50} ottenuti per i composti 1 e 34 sono confrontabili o inferiori a quello ottenuto per la RBV.

La replicazione del virus A/Solomon Island/3/06 viene inibita dal composto di riferimento RBV con un valore di EC_{50} pari a 7 μM ; per quanto riguarda i composti è stato determinato invece un valore di EC_{50} pari a 18 μM per il composto 1 e 17 μM per il composto 34 (**Tabella 15**). Il composto 3, il controllo negativo, ha un valore di $EC_{50} > 100 \mu M$.

Infine, la replicazione del virus A/PARMA/24/09 viene inibita dal composto di riferimento RBV con un valore di EC_{50} pari a 18 μM e per quanto riguarda i composti è stato

determinato un valore di EC₅₀ pari a 22,5 µM per il composto 1 e 25 µM per il composto 34 (Tabella 15). Il composto 3, il controllo negativo, ha un valore di EC₅₀ > 100 µM.

Tabella 15. Attività antivirale di RBV e dei composti in esame in cellule infettate con i ceppi clinici A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06 e A/PARMA/24/09. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto richiesta per ridurre del 50% il titolo virale determinato con metodo PRA.

Cmp	EC ₅₀ (µM) A/WSN/67/05	EC ₅₀ (µM) A/Solomon Island/3/06	EC ₅₀ (µM) A/PARMA/24/09
Cmp 1	22,5 µM	18 µM	22,5 µM
Cmp 3	> 100 µM	>100 µM	> 100 µM
Cmp 34	20 µM	17 µM	25 µM
RBV	17 µM	7 µM	18 µM

Entrambi i composti inibiscono la replicazione virale dei ceppi clinici A/WSN/67/05, A/Solomon Island/3/06 e A/PARMA/24/09 con valori di EC₅₀ confrontabili a quello del composto di riferimento utilizzato.

4.17 Effetto antivirale dei composti contro altri virus: VSV e HSV-1

Per valutare la specificità dell'effetto antivirale dei composti attivi essi sono stati saggiati contro altri virus: un altro virus a RNA (VSV) e un virus a DNA (HSV-1).

Cellule Vero sono state infettate con il virus HSV-1 a MOI 0,0005 e trattate con diverse concentrazioni dei composti (25, 50 e 100 µM) o GCV per confronto.

Per controllo alcuni campioni sono stati infettati, ma non trattati con i composti, e in alcuni di questi è stato aggiunto DMSO, il solvente in cui sono solubilizzati i composti per escludere che l'effetto di essi dipendesse dal solvente.

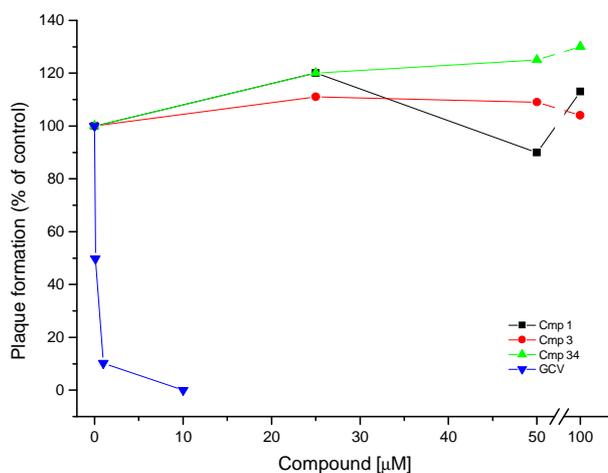


Figura 41. Caratterizzazione dell'attività antivirale dei composti in esame, e GCV come controllo, contro HSV-1. I valori riportati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Elaborando i dati riportati in **Figura 41** è stato possibile determinare il valore di EC₅₀ dei composti e del GCV utilizzato come controllo. E' stato osservato che la replicazione di viene inibita dal composto di riferimento GCV con un valore di EC₅₀ pari a 0,1 µM; per quanto riguarda i composti 1, 3 e 34 è stato determinato un valore di EC₅₀> 100µM (**Tabella 16**).

Tabella 16. Attività antivirale di GCV e dei composti in esame in cellule infettate con HSV-1. Il valore di EC₅₀ rappresenta la concentrazione di composto richiesta per ridurre del 50% la replicazione virale determinato mediante PRA.

Cmp	EC₅₀ (µM)
Cmp 1	> 100 µM
Cmp 3	> 100 µM
Cmp 34	> 100 µM
GCV	0,1 µM

Cellule L929 sono state infettate con il virus VSV a 0,005 MOI e trattate con diverse concentrazioni dei composti (25, 50 e 100 µM) o RBV per confronto.

Sono stati effettuati dei controlli in cui i campioni sono stati infettati, ma non trattati con i composti, in alcuni di questi è stato aggiunto DMSO il solvente in cui sono risospesi i composti.

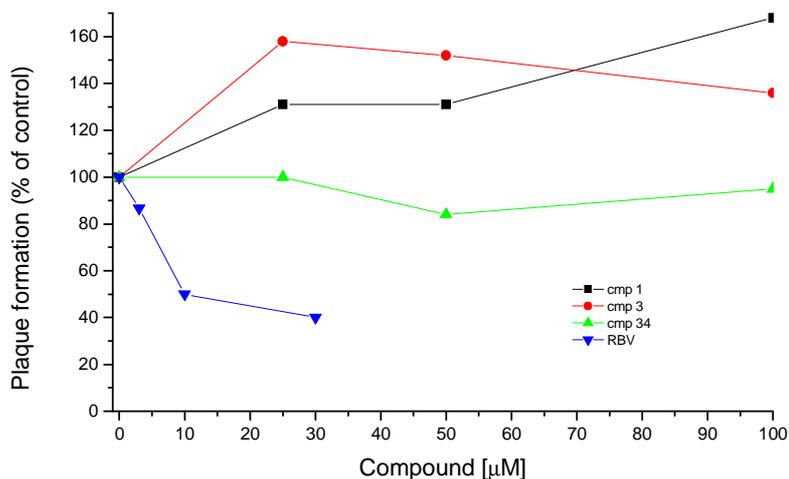


Figura 42. Caratterizzazione dell'attività antivirale dei composti in esame, e RBV come controllo, contro VSV. I valori riportati rappresentano la media di 3 esperimenti indipendenti.

Elaborando i dati riportati in **Figura 42** è stato possibile determinare il valore di EC₅₀ dei composti e della RBV utilizzata come controllo. La replicazione di VSV viene inibita dal composto di riferimento RBV con un valore di EC₅₀ pari a 10 µM, per quanto riguarda i composti è stato determinato un valore di EC₅₀> 100µM (**Tabella 17**).

Tabella 17. Attività antivirale di RBV e dei composti in esame in cellule infettate con VSV. Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione di composto richiesta per ridurre del 50% la replicazione virale determinato mediante PRA.

Cmp	EC_{50} (μM)
Cmp 1	> 100 μM
Cmp 3	> 100 μM
Cmp 34	> 100 μM
RBV	10 μM

Queste analisi hanno dimostrato che i composti 1, 3 e 34 non inibiscono la replicazione né di HSV-1 né di VSV ($EC_{50} > 100 \mu$ M), confermando la specificità della loro attività antivirale nei confronti del virus dell'influenza.

4.18 Caratterizzazione dell'effetto dei composti sull'espressione delle proteine virali

Per determinare se i composti fossero in grado di inibire anche l'espressione delle proteine virali è stato condotto un esperimento di *pulse-chase* in cui cellule MDCK sono state infettate con il virus A/PR/8/34 a MOI 5 in presenza dei composti da saggiare a concentrazione 50 μ M. La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta allo 0,1% (v/v) in tutti i campioni trattati con i composti; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro tale per cui la concentrazione finale fosse del 0,1%.

Dopo un'incubazione di 11 ore alle cellule è stata aggiunta Metionina marcata ($[^{35}\text{S}]$ Met) per un'ora in modo da marcare tutte le proteine di nuova sintesi. Al termine dell'incubazione, i campioni sono stati raccolti e analizzati in gel di poliacrilammide e successiva autoradiografia.

Come si può osservare dalla **Figura 43** i composti 1 e 34 inibiscono marcatamente l'espressione delle proteine virali (3P, HA0, NP, NS1 e M1) 12 ore post-infezione. Il composto 3, il controllo negativo, e il composto 5 non causano invece una diminuzione dell'espressione delle proteine virali.

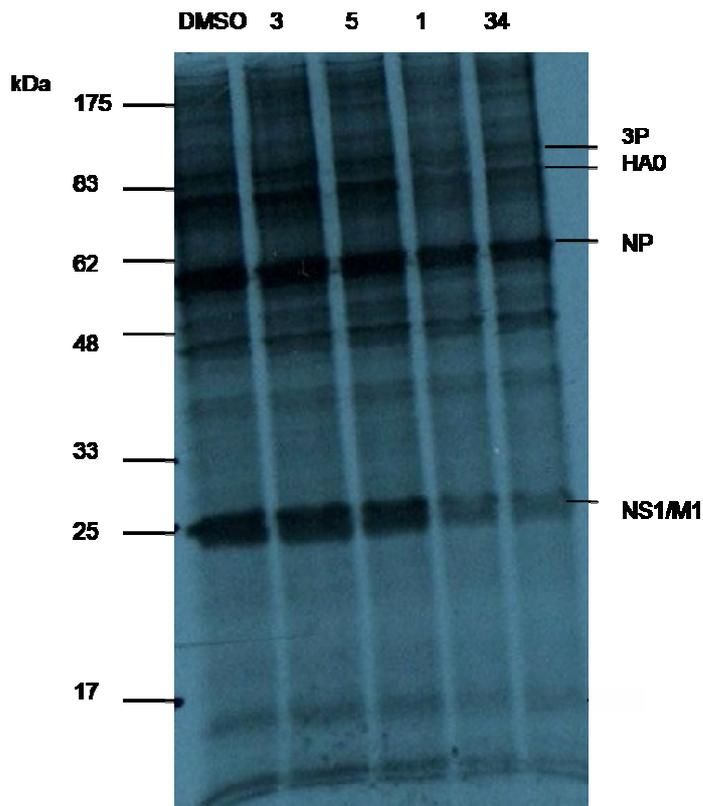


Figura 43. Caratterizzazione dell'inibizione dell'espressione proteica.

4.19 Studio dell'effetto dei composti sulla replicazione virale a diversi tempi post-infezione

Successivamente è stata valutata l'attività antivirale nel tempo del composto 34 e del composto 3, come controllo negativo. Cellule MDCK sono state infettate con il virus A/PR/8/34 a MOI 0,005 e i composti da saggiare sono stati aggiunti a concentrazione finale 50 μ M. La concentrazione finale di DMSO (utilizzato per solubilizzare i composti e per preparare le relative diluizioni d'uso) è stata mantenuta allo 0,1% (v/v) in tutti i campioni; nei campioni di controllo (non trattati con i composti) è stata aggiunto un volume di DMSO puro tale per cui la concentrazione finale fosse del 0,1%. A diversi tempi post-infezione (4, 8, 12, 24 e 48 h p.i.) è stato raccolto il medium di coltura delle cellule infettate e la progenie virale del medium è stata titolata mediante *plaque assay*.

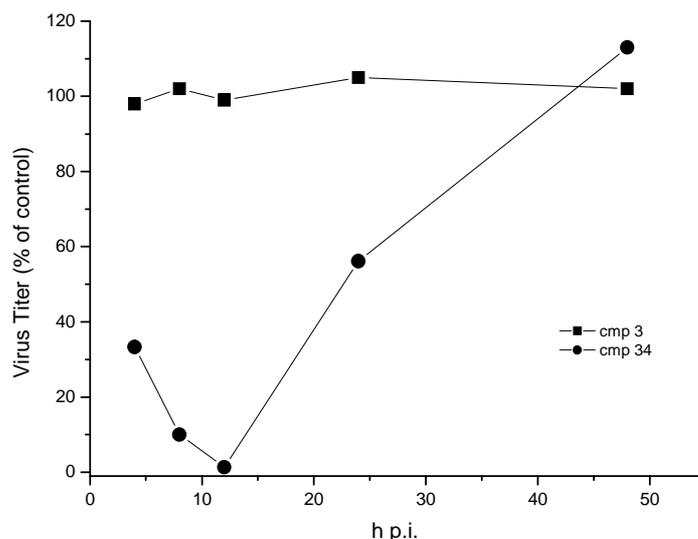


Figura 44. Caratterizzazione dell'attività antivirale nel tempo dei composti 3 e 34.

Come si può osservare in **Figura 44** il composto 34 inibisce la replicazione virale fino a 12 ore post-infezione: il titolo virale, espresso in valore percentuale rispetto al controllo non trattato con i composti, è compreso tra 0 e 10%. A 24 ore post-infezione, invece, il composto 34 perde in parte la sua capacità inibitoria, infatti il titolo virale è pari al 60% ed è pari al 100% 48 ore post-infezione. Il composto 3 non ha effetto sulla replicazione virale a nessuno dei tempi analizzati.

4.20 Studio della variazione dell'EC₅₀ dei composti a diversi tempi post-infezione

Dato che dall'esperimento di *time course* il composto 34 sembra non mantenere la sua attività nel tempo è stato condotto un esperimento per determinare il valore di EC₅₀ del composto a diversi tempi post-infezione. A tale scopo cellule MDCK sono state infettate con il virus A/PR/8/34 a MOI 0,005 in presenza dei composti da saggiare (composto 34 e composto 3 come controllo negativo) a diverse concentrazioni (0, 3, 10, 30 e 100 µM). Dopo un'incubazione di 4, 8, 12, 24 e 48 ore sono stati raccolti i mezzi di coltura delle cellule infettate e la progenie virale presente nel medium è stata titolata mediante *plaque assay*.

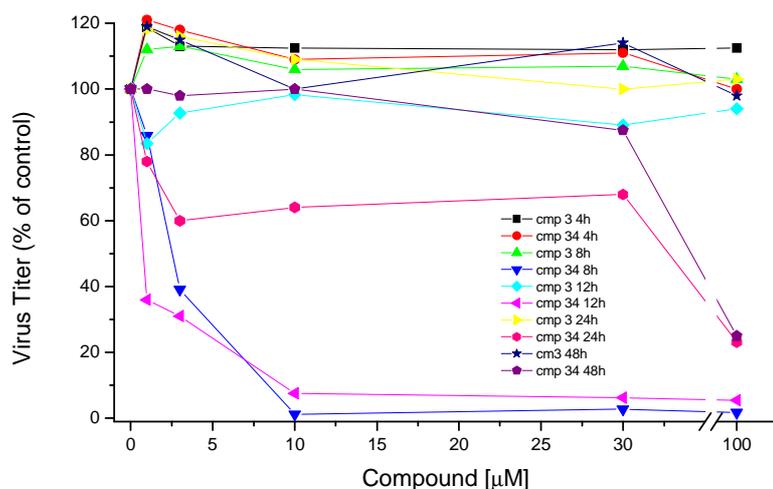


Figura 45. Caratterizzazione dell'attività antivirale nel tempo dei composti 3 e 34 a diverse concentrazioni.

Elaborando i dati riportati in **Figura 45** è stato possibile determinare il valore di EC_{50} dei composti 3 e 34 a diversi tempi post-infezione. La replicazione virale viene inibita dal composto 34 con un valore di EC_{50} pari a 2,5 μM a 8 ore post-infezione e 1 μM a 12 ore post-infezione; a 24 e 48 ore post-infezione, invece, il composto perde in parte la sua attività antivirale (rispettivamente 35 e 45 μM). Il composto 3 non inibisce la replicazione virale a nessuno dei tempi analizzati (**Tabella 18**).

Tabella 18. Attività antivirale nel tempo dei composti 3 e 34 a diverse concentrazioni. Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione di composto richiesta per ridurre del 50% il titolo virale determinato con metodo PRA.

Compound	4 hpi (EC_{50})	8 hpi (EC_{50})	12 hpi (EC_{50})	24 hpi (EC_{50})	48 hpi (EC_{50})
Cmp 3	> 100 μM	> 100 μM	> 100 μM	> 100 μM	> 100 μM
Cmp 34	> 100 μM	2.5 μM	1 μM	35 μM	45 μM

Dato che il composto 34 sembra perdere in parte la sua attività nel tempo è stato condotto un saggio analogo, in cui però il composto è stato aggiunto fresco dopo 12 e 24 ore dall'infezione, per determinare se riaggiungendo il composto fosse mantenuta costante l'attività antivirale.

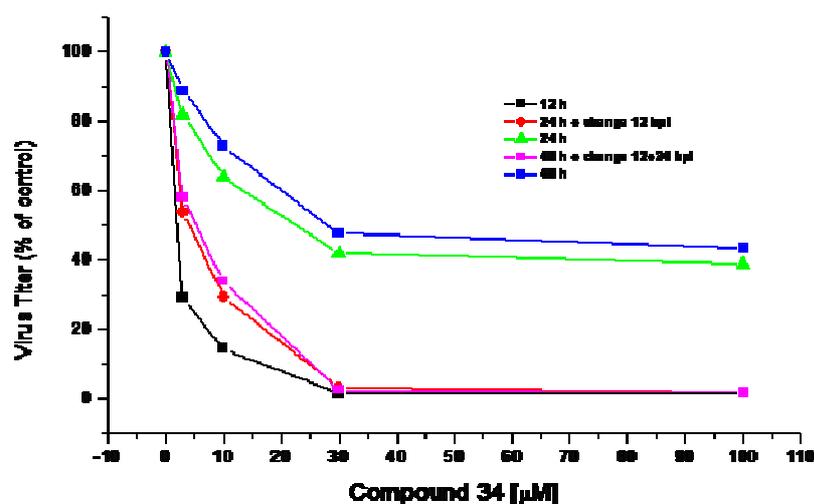


Figura 46. Caratterizzazione dell'attività antivirale nel tempo del composto 34 a diverse concentrazioni.

Analizzando la **Figura 46** è stato possibile determinare il valore di EC_{50} per ogni tempo post-infezione analizzato. Come si può osservare è stato confermato che il composto 34 perde in parte la sua attività inibitoria nel tempo, ma se questo viene riaggiunto alle cellule in un mezzo fresco l'attività inibitoria viene mantenuta (**Tabella 19**).

Tabella 19. Attività antivirale nel tempo del composto 34 a diverse concentrazioni. Il valore di EC_{50} rappresenta la concentrazione di composto richiesta per ridurre del 50% il titolo virale determinato mediante PRA.

	12 hpi (EC_{50})	24 hpi+ change 12 hpi (EC_{50})	24 hpi (EC_{50})	48 hpi+ change 12 and 24 hpi (EC_{50})	48 hpi (EC_{50})
Cmp 34	2,5 μ M	5 μ M	22,5 μ M	6 μ M	30 μ M

4.21 Effetto dei composti su un singolo ciclo di replicazione virale

Dato che il composto 34 è attivo a basse concentrazioni (EC_{50} 1-2,5 μ M) a tempi precoci post-infezione è stato valutato l'effetto del composto 34 e in parallelo dei composti 3 e 5 su un singolo ciclo di replicazione virale. Cellule MDCK sono state infettate con il virus A/PR/8/34 a MOI 5 in presenza dei composti da saggiare a concentrazione finale 50 μ M. Un'ora dopo l'infezione, le cellule sono state trattate con una soluzione di lavaggio acida (NaCl 150 mM, HCl 10 mM) che inattiva i virioni non penetrati. Dopo un'incubazione di 12 ore, che corrisponde a un ciclo di replicazione virale, sono stati raccolti i mezzi di coltura delle cellule infettate e la progenie virale presente nel medium è stata titolata mediante PA.

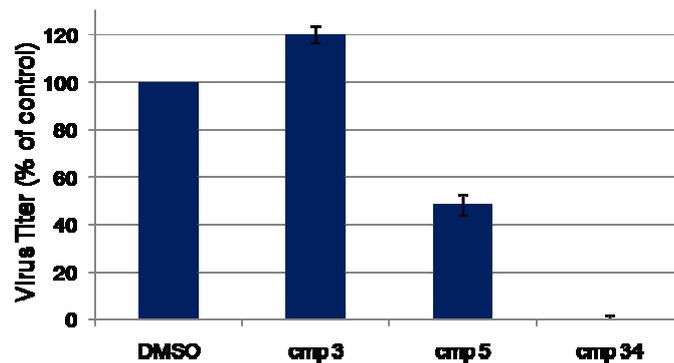


Figura 47. Caratterizzazione dell'attività antivirale dei composti 3, 5 e 34 in un singolo ciclo di replicazione virale.

Come si può osservare in **Figura 47** il composto 34 inibisce del 100% la replicazione del virus quando si analizza un singolo ciclo di replicazione. Il composto 5 ha attività inibitoria del 50% sulla replicazione virale, mentre il composto 3 non ha attività antivirale (**Figura 47**). Questo esperimento conferma che il composto 34, ma anche il composto 5, possiedono un'attività antivirale a tempi precoci post-infezione (12 h p.i.).

4.22 Studio dell'effetto dei composti sulla traslocazione nucleare del complesso PA/PB1

Poiché, come descritto in precedenza, il saggio BiFC non si è rivelato efficiente e non si è quindi potuto utilizzarlo per caratterizzare la capacità dei composti di dissociare il complesso PA/PB1 in contesto cellulare, si è deciso di caratterizzare questa attività dei composti mediante un altro tipo di saggio. Si è deciso infatti di sfruttare il fatto che è noto che l'interazione tra le proteine PA e PB1 avviene nel citoplasma della cellula ospite, il complesso viene successivamente traslocato nel nucleo cellulare dove si assembla con PB2 che invece viene importata indipendentemente (Nieto *et al.*, 1994). L'efficienza dei composti 5 e 34 nell'inibire l'interazione PA/PB1 in un contesto cellulare è stata valutata analizzando la loro capacità di inibire la traslocazione del complesso nel nucleo cellulare. Cellule HEK 293T sono state trasfettate con i plasmidi pcDNA-GFP-PA e pcDNA-PB1, o pcDNA-GFP-PA e pcDNA-PB2 come controllo negativo, in presenza o meno dei composti a concentrazione finale 50 μ M. Dopo 12 ore di incubazione, le cellule sono state colorate con DAPI per permettere di visualizzare i nuclei cellulari e analizzate mediante microscopio a fluorescenza.

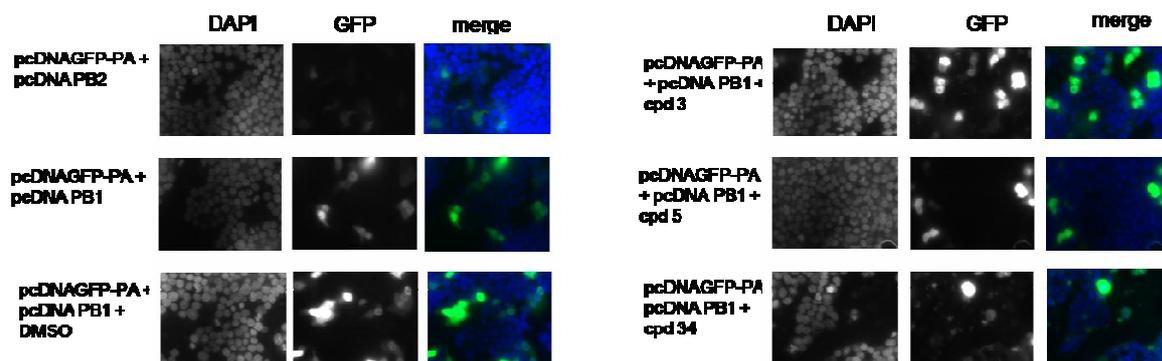


Figura 48. Caratterizzazione dell'attività inibitoria dei composti 3, 5 e 34 sulla traslocazione nucleare del complesso PA/PB1.

In **Figura 48** si può osservare come cellule trasfettate con i plasmidi pcDNA-GFP-PA e pcDNA-PB2, la proteina di fusione GFP-PA non sia presente nei nuclei cellulari, ma solo nel citoplasma, in quanto è necessaria la presenza di PB1 perché GFP-PA venga importata al nucleo. Invece, cellule trasfettate con pcDNA-GFP-PA e pcDNA-PB1 in presenza o meno del solvente DMSO o del composto 3 mostrano nuclei cellulari verdi poiché PA e PB1 interagiscono tra di loro e vengono importate nel nucleo e non vi è inibizione da parte del DMSO o del composto 3 della traslocazione nucleare del complesso PA/PB1. Anche cellule trasfettate con pcDNA-GFP-PA e pcDNA-PB1 in presenza del composto 5 mostrano nuclei cellulari verdi indicando che questo composto non inibisce, o comunque non in maniera significativa, l'interazione tra PA e PB1 che quindi vengono quindi importate nel nucleo cellulare. Cellule trasfettate, invece, con pcDNA-GFP-PA e pcDNA-PB1 in presenza del composto 34 non mostrano nuclei cellulari verdi poiché questo composto inibisce l'interazione PA e PB1 e quindi il complesso PA/PB1 non viene importato nel nucleo cellulare. Questo saggio conferma l'attività antivirale del composto 34 e in particolare la sua capacità di agire come inibitore dell'interazione PA/PB1 anche in un contesto cellulare.

4.23 Caratterizzazione dell'attività antivirale contro il virus dell'influenza di Stealth siRNA diretti contro la polimerasi virale

In collaborazione con il gruppo della Dott.ssa Livia Di Trani dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) di Roma è stata valutata l'attività antivirale di alcuni Stealth siRNA diretti contro la polimerasi del virus dell'influenza ed in particolare in grado di inibire l'espressione del gene *PB1* e della regione di *PB1* codificante la proteina PB1-F2. Sono stati disegnati tre Stealth siRNA utilizzando il virus A/It/PARMA/5/06 che hanno come bersaglio diverse regioni del trascritto di *PB1*. Il gruppo della Dott.ssa Livia Di Trani identificato un siRNA in grado di inibire la replicazione virale in cellule A549 trasfettate con i diversi siRNA e successivamente infettate con il virus dell'influenza. L'attività inibitoria di ciascuno Stealth siRNA è stata valutata mediante Real Time PCR quantitativa (dati non mostrati).

4.23.a Studio della citotossicità degli Stealth siRNA in cellule HEK 293T

Per determinare se gli Stealth siRNA fossero citotossici, cellule HEK 293T sono state trasfettate con ciascun siRNA a diverse concentrazioni e successivamente è stato condotto un saggio di citotossicità (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.19). In questo caso è stato necessario trasfettare le cellule con gli Stealth siRNA (e non è bastato solamente aggiungerli al mezzo di coltura) in quanto essi hanno bisogno di essere veicolati all'interno della cellula. I valori di assorbanza ottenuti sono stati riportati in grafico in relazione alle concentrazioni di composto saggiate. Elaborando i dati, sono stati determinati i valori di CC_{50} .

In **Tabella 20** sono riportati i valori di CC_{50} ottenuti per ciascun Stealth siRNA dalle media di 3 esperimenti indipendenti.

Tabella 20. Citotossicità degli Stealth siRNA in cellule HEK 293T. Il valore di CC_{50} rappresenta la concentrazione di siRNA che causa citotossicità sul 50% delle cellule (misurato con metodo MTT).

STEALTH siRNA	CC_{50} (nM)
STEALTH 376	> 100 nM
STEALTH 402	> 100 nM
STEALTH 1695	> 100 nM
Scramble siRNA	> 100 nM

Gli Stealth siRNA non sono citotossici in cellule HEK 293T (almeno fino alle concentrazioni saggiate), infatti i valori di CC_{50} ottenuti sono > 100 nM.

4.23.b Caratterizzazione dell'attività inibitoria degli Stealth siRNA contro la polimerasi del virus dell'influenza

L'attività antivirale degli Stealth siRNA in esame è stata valutata mediante *minireplicon assay*. Il saggio è stato condotto aggiungendo gli Stealth siRNA a due diverse concentrazioni (15 e 30 nM). È stato incluso uno *scramble* siRNA (ossia un siRNA avente basi casuali) come controllo negativo.

I valori di luminescenza ottenuti sono stati riportati in valore percentuale considerando il controllo non trattato con gli Stealth siRNA (controllo denominato 3PNP) come 100% e poi utilizzati per costruire un grafico che mette in relazione le RLU espresse in questo valore percentuale (valore percentuale rispetto al controllo non trattato) con la concentrazione di composto utilizzato (**Figura 49**).

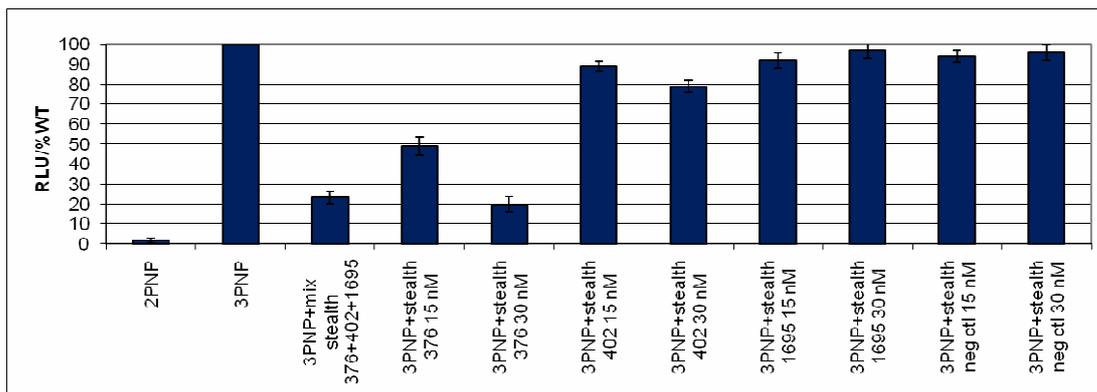


Figura 49. Effetto degli Stealth RNA sull'attività polimerasica del virus dell'influenza A in saggi di minireplicon. RLU: *Relative Light Units* corrispondenti alla luminescenza emessa da cellule trasfettate con il costrutto plasmidico contenente il gene *reporter* della luciferasi; RLU/%WT: RLU espresse in questo valore percentuale (valore percentuale rispetto al controllo non trattato); 2PNP: cellule trasfettate con pcDNA-PA, pcDNA-PB1, pcDNA-NP, pPolI-Luc; 3PNP: cellule trasfettate con pcDNA-PA, pcDNA-PB1, pcDNA-PB2, pcDNA-NP, pPolI-Luc. I valori riportati sono stati ottenuti dalle media di 3 esperimenti indipendenti.

Come si può osservare in **Figura 49** lo Stealth siRNA 376 causa una marcata diminuzione dell'espressione del gene *reporter* in maniera dose-dipendente dovuta all'inibizione dell'attività della RNA polimerasi virale. Gli Stealth siRNAs 402 e 1695 non causano diminuzione dell'espressione del gene *reporter* e quindi sono stati considerati inattivi. Il controllo negativo non diminuisce l'espressione del gene *reporter* come atteso. Sono attualmente in corso studi mirati a valutare se l'inibizione dell'attività della RNA polimerasi da parte dello siRNA376 osservata in questi esperimenti sia effettivamente dovuta ad una diminuzione dell'espressione del gene *PB1*.

5. Conclusioni

I farmaci correntemente utilizzati nella terapia delle infezioni da virus influenzali presentano numerosi svantaggi, tra cui effetti collaterali a livello neurologico, la necessità di assunzione entro tempi precoci in seguito all'infezione, l'impossibilità di somministrazione a bambini al di sotto dei 12 anni d'età e a donne in gravidanza, infine l'induzione della comparsa di ceppi virali resistenti. Per questi motivi esiste la necessità reale di sviluppare nuovi farmaci anti-influenzali in grado di colmare queste lacune e da affiancare al vaccino che risulta essere attualmente insufficiente per far fronte alle epidemie che si verificano ogni anno e ad eventuali pandemie influenzali. Lo scopo dell'attività di ricerca svolta durante questo dottorato era quello di identificare nuovi composti anti-influenza dotati di caratteristiche peculiari e con un nuovo meccanismo d'azione. Bersaglio di questi composti è l'RNA polimerasi virale, ma a differenza di altri farmaci, come la ribavirina, queste molecole non agiscono direttamente sull'attività catalitica polimerasica, ma attraverso l'inibizione della formazione del complesso eterotrimerico della polimerasi. Mediante uno *screening in silico* di molecole virtuali utilizzando la struttura cristallografica della proteina PA complessata con la porzione N-terminale di PB1 sono stati selezionati 32 composti potenzialmente in grado di dissociare l'interazione PA/PB1. Attraverso questo *screening* sono stati, quindi, identificati dei nuovi potenziali composti anti-influenzali che agiscono in maniera diversa dai farmaci comunemente utilizzati.

Le molecole così selezionate sono state successivamente sottoposte ad analisi volte a valutare la loro capacità di dissociare l'interazione *in vitro* delle proteine PA e PB1, di inibire l'attività polimerasica e la replicazione virale di diversi ceppi di influenza A e B, di inibire la traslocazione nel nucleo del complesso della polimerasi e l'espressione delle proteine virali. Mediante queste analisi sono stati identificati due composti, composto 1 e composto 34, che sembrano essere i più promettenti. E' stata in primo luogo confermata la loro capacità di inibire l'interazione *in vitro* tra PA e PB1. Come atteso essi inibiscono questa interazione, in maniera analoga al peptide di controllo. Questa interazione è molto conservata tra i diversi ceppi di influenza A e B, per questo motivo lo *screening in silico* ci ha permesso di identificare delle molecole potenzialmente attive contro diversi ceppi di influenza ovviando al problema della variabilità genica del virus. Infatti è stato dimostrato che questi composti sono in grado di inibire l'attività polimerasica sia del virus dell'influenza A (composto 1 e composto 34) che del virus dell'influenza B (composto 34, composto 1 non determinato). Questo ci ha permesso di confermare che i composti agiscono a livello di un bersaglio conservato tra influenza A e B e che essi sono in grado di inibire l'interazione PA/PB1 anche in un contesto cellulare utilizzando forme intere delle proteine. I composti 1 e 34 inibiscono inoltre la replicazione del virus con valori di EC_{50} confrontabili con quelli della ribavirina (EC_{50} 18-22,5 μ M composto 1; EC_{50} 17-25 μ M composto 34; EC_{50} 7-18 μ M RBV). E' stata dimostrata la capacità dei composti di inibire la replicazione non solo di ceppi di laboratorio del virus dell'influenza A, ma anche di ceppi clinici isolati da pazienti, e del virus dell'influenza B. Queste molecole, quindi, oltre ad avere un'attività antivirale comparabile a quella di un composto di riferimento, la RBV, sono attivi contro diversi ceppi di influenza anche in un saggio che mima la replicazione virale. Entrambi i composti hanno mostrato capacità di inibire l'espressione delle proteine virali, inoltre per il composto 34 si è dimostrato in grado di bloccare l'importo del complesso PA/PB1 nel nucleo. La specificità dell'attività antivirale dei composti 1 e 34 contro il virus dell'influenza è stata valutata determinando la loro capacità di inibire la

replicazione virale di un altro virus a RNA e di un virus a DNA. Dato che i composti non hanno mostrato attività antivirale contro questi virus possiamo concludere che essi possiedono attività antivirale specifica contro il virus dell'influenza.

L'attività antivirale del composto 34 è stata caratterizzata anche a diversi tempi post-infezione ed è stato osservato che esso perde in parte la sua attività antivirale dopo 24 ore dall'infezione (EC_{50} 1-2 μ M fino a 12 ore post-infezione). Essa però viene mantenuta se il composto viene riaggiunto fresco nel mezzo di coltura ogni 12 ore. E' nostra ipotesi che il composto perda in parte la sua attività nel tempo perché modificato da enzimi cellulari o più probabilmente perché, essendo una molecola abbastanza idrofobica, va incontro a precipitazione nel medium cellulare e quindi ad una diminuzione della concentrazione del composto solubile.

Quello che possiamo concludere è che è stato identificato un composto che inibisce la replicazione del virus dell'influenza A e B in maniera comparabile o maggiore ai valori di peptide e RBV, con attività antivirale specifica contro il virus dell'influenza. Inoltre i farmaci comunemente utilizzati in terapia (Oseltamivir, Zanamivir e adamantani) mostrano attività antivirale comparabile al nostro composto (EC_{50} =0.4-9 μ M e 0.3-7 μ M rispettivamente per oseltamivir e zanamivir; EC_{50} =49-57 μ M e 19-39 μ M rispettivamente per amantadina e rimantadina; i valori dipendono dal tipo di ceppo del virus influenzale utilizzato e dalla linea cellulare usata). Il composto 34 potrebbe quindi essere considerato un buon candidato per lo sviluppo di un farmaco anti-influenza.

Un'altra strategia per identificare inibitori della replicazione del virus dell'influenza è l'utilizzo di Stealth siRNA diretti contro l'mRNA di PB1. E' stato identificato un siRNA in grado di inibire la replicazione del virus (dati non mostrati) e l'attività polimerasica (inibizione dell'80% a concentrazione 30 nM). Anche questo siRNA costituisce un possibile punto di partenza per lo sviluppo di nuovi agenti anti-influenza.

6. Bibliografia

Amorim M.J., Digard P. (2006). Influenza A virus and the cell nucleus. *Vaccine*, **24**, 6651-6655.

Asano Y., Ishihama A. (1997). Identification of two nucleotide-binding domains on the PB1 subunit of influenza virus RNA polymerase. *J Biochem*, **122**, 627-634.

Baroni M., Cruciani G., Sciabola S., Perrucio F., Mason J. S. (2007). A common reference framework for analyzing/comparing proteins and ligands. Fingerprints for ligands and proteins (FLAP): Theory and application. *J Chem Inf Model*, **47**, 279-294.

Baudin F., Petit I., Weissenhorn W., Ruigrok R.W. (2001). In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*, **281**, 102-108.

Beaton A.R., Krug R.M. (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6282-6286.

Bergmann M., Garcia-Sastre A., Carnero E., Pehamberger H., Wolff K., Palese P., Muster T. (2000). Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J Virol*, **74**, 6203-6206.

Biswas S.K., Nayak D.P. (1994). Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein. *J Virol*, **68**, 1819-1826.

Biswas S.K., Boutz P.L., Nayak D.P. (1998). Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol*, **72**, 5493-5501.

Bodian D.L., Yamasaki R.B., Buswell R.L., Stearns J.F., White J.M., Kuntz I.D. (1993). Inhibition of the fusion-inducing conformational change of influenza hemagglutinin by benzoquinones and hydroquinones. *Biochemistry*, **32**, 2967-2978.

Bosch F.X., Garten W., Klenk H.D., Rott R. (1981). Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian influenza viruses. *Virology*, **113**, 725-735.

Boulo S., Akarsu H., Ruigrok R.W., Baudin F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res*, **124**, 12-21.

Brodersen D.E., Clemons W.M. Jr, Carter A.P., Wimberly B.T., Ramakrishnan V. (2002). Crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16S RNA. *J Mol Biol*, **316**, 725-768.

Bui M., Whittaker G., Helenius A. (1996). Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol*, **70**: 8391-8401.

Bui M., Wills E.G., Helenius A., Whittaker G.R. (2000). Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol*, **74**: 1781-1786.

Bussey K.A., Bousse T.L., Desmet E.A., Kim B., Takimoto T. (2010). PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells. *J Virol*, **84**, 4395-4406.

Chen J., Lee K.H., Steinhauer D.A., Stevens D.J., Skehel J.J., Wiley D.C. (1998). Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell*, **95**, 409-417.

Chen W., Calvo P.A., Malide D., Gibbs J., Schubert U., Bacik I., Basta S., O'Neill R., Schickli J., Palese P., Henklein P., Bennink J.R., Yewdell J.W. (2001). A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*, **7**, 1306-12.

Cheong H-K., Cheong C., Choi B-S. (1996). Secondary structure of the panhandle RNA of influenza virus A studied by NMR spectroscopy. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4197-4201.

Cohen E.A., Gaudreau P., Brazeau P., Langelier Y. (1986). Specific inhibition of herpesvirus ribonucleotide reductase by a nonapeptide derived from the carboxy terminus of subunit 2. *Nature*, **321**, 441-443.

Coloma R., Valpuesta J.M., Arranz R., Carrascosa J.L., Ortín J., Martín-Benito J. (2009). The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. *PLoS Pathog*, **5**, e1000491.

Compans R.W., Klenk H.D., Caliguri L.A., Choppin P.W. (1970). Influenza virus proteins. I. Analysis of polypeptides of the virion and identification of spike glycoproteins. *Virology*, **42**, 880-889.

Compans R.W., Content J., Duesberg P.H. (1972). Structure of ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol*, **10**, 795-800.

De Clercq E. (2004). Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 704-720.

Dias A., Bouvier D., Crepin T., McCarthy A.A., Hart D.J., Baudin F., Cusack S., Ruigrok R. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*, **458**, 1-5.

Digard P., Elton D., Bishop K., Medcalf E., Weeds A., Pope B. (1999). Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J Virol*, **73**, 2222-2231.

Drake J.W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 4171-4175.

Dutia B.M. (1983). Ribonucleotide reductase induced by herpes simplex virus has a virus-

specified constituent. *J Gen Virol*, **64**, 513-521.

Dutia B.M., Frame M.C., Subak-Sharpe J.H., Clark W.N., Marsden H.S. (1986). Specific inhibition of herpesvirus ribonucleotide reductase by synthetic peptides. *Nature*, **321**, 439-441.

Elton D., Simpson-Holley M., Archer K., Medcalf L., Hallam R., McCauley J., Digard P. (2001). Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol*, **75**, 408-419.

Engelhardt O.G., Smith M., Fodor E. (2005). Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol*, **79**, 5812-5818.

Engelhardt O.G., Fodor E. (2006). Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev Med Virol*, **16**, 329-345.

Fodor E., Seong B.L., Brownlee G.G. (1993). Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *J Gen Virol*, **74**, 1327-1333.

Fodor E., Pritlove D.C., Brownlee G.G. (1994). The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *J Virol*, **68**, 4092-4096.

Fodor E., Pritlove D.C., Brownlee G.G. (1995). Characterization of the RNA-fork model of the virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J Virol*, **69**, 4012-4019.

Fodor E., Mingay L.J., Crow M., Deng T., Brownlee G.G. (2003). A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol*, **77**, 5017-5020.

Fortes P., Lamond A.I., Ortín J. (1995). Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. *J Gen Virol*, **76**, 1001-1007.

Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, **79**, 2814-22.

Fujii Y., Goto H., Watanabe T., Yoshida T., Kawaoka Y. (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2002-2007.

Furuta Y., Takahashi K., Fukuda Y., Kuno M., Kamiyama T., Kozaki K., Nomura N., Egawa H., Minami S., Watanabe Y., Narita H., Shiraki K. (2002). In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 977-981.

Furuta Y., Takahashi K., Kuno-Maekawa M., Sangawa H., Uehara S., Kozaki K., Nomura N., Egawa H., Shiraki K. (2005). Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 981-986.

Gabriel G., Herwig A., Klenk H.D. (2008). Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog*, **4**, e11.

Garten W., Klenk H.D. (1983). Characterization of the carboxypeptidase involved in the proteolytic cleavage of the influenza haemagglutinin. *J Gen Virol*, **64**, 2127-37.

Gastaminza P., Perales B., Falcon A. M., Ortín J. (2003). Mutations in the N-Terminal Region of Influenza Virus PB2 Protein Affect Virus RNA Replication but Not Transcription. *J Virol*, **77**, 5098-5018.

Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., Chen J. (2003). RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2718-2723.

Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. (2004). Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 8676-8681.

Ghanem A., Mayer D., Chase G., Tegge W., Frank R., Kochs G., Garcia-Sastre A., Schwemmle M. (2007). Peptide-mediated interference with Influenza A virus polymerase. *J Virol*, **81**, 7801-7804.

Gibbs J.S., Malide D., Hornung F., Bennink J.R., Yewdell J.W. (2003). The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol*, **77**, 7214-7224.

González S., Zürcher T., Ortín J. (1996). Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4456-4463.

Gonzales S., Ortin J. (1999). Characterization of Influenza Virus PB1 Protein Binding to Viral RNA: Two Separate Regions of the Protein Contribute to the Interaction Domain. *J Virology*, **73**, 631-637.

Goto H., Kawaoka Y. (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10224-10228.

Guilligay D., Tarendeau F., Resa-Infante P., Coloma R., Crepin T., Sehr P., Lewis J., Ruigrok R.W. H., Ortin J., Hart D.J., Cusack S. (2008). The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol*, **5**, 500-506.

Guo Y.J., Jin F.G., Wang P., Wang M., Zhu J.M. (1983). Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *J Gen Virol*, **64**: 177-182.

Guu T.S.Y., Dong L., Wittung-Stafshede P., Tao Y.J. (2008). Mapping the domain structure of the influenza A virus polymerase acidic protein (PA) and its interaction with the basic protein 1 (PB1) subunit. *Virology*, **379**, 135–142.

Hankins R.W., Nagata K., Kato A., Ishihama A. (1990). Mechanism of influenza virus transcription inhibition by matrix (M1) protein. *Res Virol*, **141**, 305-314.

Hara K., Shiotab M., Kidob H., Ohtsua Y., Toyoda T. (2001). Protease activity of influenza virus RNA polymerase PA subunit. *International Congress Series*, **1219**, 479–485.

Hara K., Schmidt F. I., Crow M., Brownlee G.G. (2006). Amino Acid Residues in the N-Terminal Region of the PA Subunit of Influenza A Virus RNA Polymerase Play a Critical Role in Protein Stability, Endonuclease Activity, Cap Binding, and Virion RNA Promoter Binding. *J Virol*, **80**, 7789–7798.

Hay A.J. Zambon M.C., Wolstenholme A.J., Skehel J.J., Smith M.H. (1986) Molecular basis of resistance of influenza A viruses to amantadine. *J Antimicrob Chemoter*, **18**, 19-29.

He X., Zhou J., Bartlam M., Zhang R., Ma J., Lou Z., Li X., Jioachimiak A., Zeng Z., Ge R., Rao Z., Liu Y. (2008). Crystal structure of the polymerase PA_C-PB1_N complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature*, **454**, 1123-1126.

Hodel A.E., Gershon P.D., Quioco F.A. (1998). Structural basis for sequence-nonspecific recognition of 5'-capped mRNA by a cap-modifying enzyme. *Mol Cell*, **1**, 443-447.

Honda A., Uéda K., Nagata K., Ishihama A. (1988). RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem*, **104**, 1021-1026.

Huang T.S., Palese P., Krystal M. (1990). Determination of Influenza Virus Proteins Required for Genome Replication. *Virology*, **64**, 5669-5673

Hui E.K., Barman S., Tang D.H., France B., Nayak D.P. (2006). YRKL sequence of influenza virus M1 functions as the L domain motif and interacts with VPS28 and Cdc42. *J Virol*, **80**, 2291-2308.

Hutchinson E.C., von Kirchbach J.C., Gog J.R., Digard P. (2010). Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol*, **91**, 313-28.

Jackson D.A., Caton A.J., McCready S.J., Cook P.R. (1982). Influenza virus RNA is synthesized at fixed sites in the nucleus. *Nature*, **296**, 366-8.

Jorba N., Coloma R., Ortín J. (2009). Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication. *PLoS Pathog*, **5**, e1000462.

Kashiwagi T., Leung W., Deng T., Chen H., Brownlee G.G. (2009). The N-Terminal Region of the PA Subunit of the RNA Polymerase of Influenza A/HongKong/156/97 (H5N1) Influences Promoter Binding. *PLoS One*, **5**, 1-11.

Kati W.M., Montgomery D., Carrick R., Gubareva L., Maring C., McDaniel K., Steffy K., Molla A., Hayden F., Kempf D., Kohlbrenner W. (2002). In vitro characterization of A-315674, a highly potent inhibitor of A and B strain influenza virus neuraminidases and influenza virus replication. *Antimicrob Agents Chem*, **46**, 1014-1021.

Kawaguchi A., Naito T., Nagata K. (2005). Involvement of Influenza Virus PA Subunit in Assembly of Functional RNA Polymerase Complexes. *J Virol*, **79**, 732-744.

Kerry P., Willsher N., Fodor E. (2008). A cluster of conserved basic amino acids near the C-terminus of the PB1 subunit of the influenza virus RNA polymerase is involved in the regulation of viral transcription. *Virology*, **373**, 202-210.

Kingsbury D.W. (1970). Replication and functions of myxovirus ribonucleic acids. *Prog Med Virol*, **12**, 49-77.

Kiso M., Mitamura K., Sakai-Tagawa Y., Shiraishi K., Kawakami C., Kimura K., Hayden F.G., Sugaya N., Kawaoka Y. (2004). Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet*, **364**, 759-765

Kiso M., Takahashi K., Sakai-Tagawa Y., Shinya K., Sakabe S., Le Q.M., Ozawa M., Furuta Y., Kawaoka Y. (2010). T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 882-887.

Klenk H.D., Garten W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol*, **2**, 39-43.

Klumpp K., Ruigrok R.W., Baudin F. (1997). Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO J*, **16**, 1248-1257.

Krug R.M., Broni B.A., Bouloy M. (1979). Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs? *Cell*, **18**, 329-334.

Lamb R.A., Choppin P.W., Chanock R.M., Lai C.J. (1980). Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1857-1861.

Lee M.T.M., Bishop K., Medcalf L., Elton D., Digard P., Tiley L. (2002). Definition of the minimal components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, **20**, 429-438.

Li M.L., Rao P., Krug R.M. (2001). The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J*, **20**, 2078-2086.

Liao T.L., Wu C.Y., Su W.C., Jeng K.S., Lai M.M. (2010). Ubiquitination and deubiquitination of NP protein regulates influenza A virus RNA replication. *EMBO J*, **29**, 3879-3890.

Londo D.R., Davis A.R., Nayak D.P. (1983). Complete nucleotide sequence of the nucleoprotein gene of influenza B virus. *J Virol*, **47**, 642-648.

Loregian A., Marsden H.S., Palù G. (2002). Protein-protein interactions as targets for antiviral chemotherapy. *Rev Med Virol*, **12**, 239-262.

Loregian A., Appleton B.A., Hogle J., Coen D.M. (2004a). Residues of human cytomegalovirus DNA polymerase catalytic subunit UL54 that are necessary and sufficient for interaction with the accessory protein UL44. *J Virol*, **78**, 158-167.

Loregian A., Appleton B., Hogle J.M., Coen D.M. (2004b). Specific Residues in the Connector Loop of the Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Accessory Protein UL44 Are Crucial for Interaction with the UL54 Catalytic Subunit. *J Virol.*, **78**, 1-9.

Loregian A., Palù G. (2005a). Disruption of the interactions between the subunits of herpesvirus DNA polymerases as a novel antiviral strategy. *Clin Microbiol Infect*, **11**, 437-446.

Loregian A., Palù G. (2005b). Disruption of protein-protein interactions: towards new targets for chemotherapy. *J Cell Physiol*, **204**, 750-762.

Loregian A., Coen D.M. (2006). Selective anti-cytomegalovirus compounds discovered by screening for inhibitors of subunit interactions of the viral polymerase. *Chem Biol*, **13**, 191-200.

Lu Y., Qian X.Y., Krug R.M. (1994). The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev*, **8**, 1817-1828.

Luo G.X., Luytjes W., Enami M., Palese P. (1991). The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol*, **65**, 2861-2867.

Marcello A., Loregian A., Cross A., Marsden H.S., Hirst T.R., Palù G. (1994). Specific inhibition of herpes virus replication by receptor-mediated entry of an antiviral peptide linked to *Escherichia coli* enterotoxin B subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 8994-8998.

Marcotrigiano J., Gingras A.C., Sonenberg N., Burley S.K. (1997). Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell*, **89**, 951-961.

Mazur I., Anhlán D., Mitzner D., Wixler L., Schubert U., Ludwig S. (2008). The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. *Cell Microbiol*, **10**, 1140-1152.

McAuley J. L., Hornung F., Boyd K. L., Smith A. M., McKeon R., Bennink J., Yewdell J. W., McCown M.F., Pekosz A. (2005). The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *J Virol*, **79**, 3595-3605.

McCullers J. A. (2007). Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe*, **2**, 240-249.

- Momose F., Basler C.F., O'Neill R.E., Iwamatsu A., Palese P., Nagata K.** (2001). Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol*, **75**, 1899-1908.
- Monto A.S.** (2006). Vaccines and antiviral drugs in pandemic preparedness. *Emerg Infect Dis*, **12**, 55–60.
- Moscona A.** (2005). Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*, **353**, 1363-1373.
- Moya A., Holmes E.C., González-Candelas F.** (2004). The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nat Rev Microbiol*, **2**, 279-288.
- Murti K.G., Webster R.G., Jones I.M.** (1988). Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. *Virology*, **164**, 562-566.
- Neumann G., Castrucci M.R., Kawaoka Y.** (1997). Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol*, **71**, 9690-700.
- Neumann G., Brownlee G.G., Fodor E., Kawaoka Y.** (2004). Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, **283**, 121-143.
- Newcomb L.L., Kuo R., Ye Q., Jiang Y., Tao Y.J., Krug R.M.** (2008) Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J Virol*, **83**, 29-36.
- Nieto A., de la Luna S., Bfircena J., Portela A., Ortin J.** (1994). Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol*, **75**, 29-36.
- Noton S.L., Medcalf E., Fisher D., Mullin A.E., Elton D., Digard P.** (2007). Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *J Gen Virol*, **88**, 2280-90.
- Obayashi E., Yoshida H., Kawai F., Shibayama N., Kawaguchi A., Nagata K., Tame J.R., Park S.Y.** (2008) The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature*, **454**, 1127-31.
- Ohtsu Y., Honda Y., Sakata Y., Kato H., Toyoda T.** (2001). Fine mapping of the subunit binding site of influenza virus RNA polymerase. *Microbiol Immunol*, **46**, 167-175.
- O'Neill R.E., Talon J., Palese P.** (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*, **17**, 288- 296.
- Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A.** (2000). Influenza B virus in seals. *Science*, **288**, 1051-1053.

- Palese P., Compans R.W.** (1976). Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol*, **33**, 159-63.
- Palese P.** (2007). Orthomyxoviridae. *Fields Virology*, (4th edition) (Knipe, D.M. and Howley, P.M., eds), pp. 1647-1689, Lippincott Williams & Wilkins.
- Peiris, J.S. Yu W.C., Leung C.W., Cheung C.Y., Ng W.F., Nicholls J.M., Ng T.K., Chan K.H., Lai S.T., Lim W.L., Yuen K.Y., Guan Y.** (2004). Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet*, **363**, 617–619.
- Perales B., de la Luna S., Palacios I., Ortin J.** (1996). Mutational Analysis Identifies functional Domains in the Influenza A Virus PB2 Polymerase Subunit. *J Virol*, **70**, 1678–1686.
- Perez D.R., Donis R.O.** (1995). A 48-Amino-Acid Region of Influenza A Virus PB1 Protein Is Sufficient for Complex Formation with PA. *J Virol*, **69**, 6932-6939.
- Perruccio F., Mason J. S., Sciabola S., Baroni M.** (2006). FLAP: 4-Point Pharmacophore Fingerprints from GRID. *Molecular Interaction Fields*. (Cruciani G., Ed), pp. 83-102, Wiley-VCH: Weinheim, Germany.
- Pinto L.H., Holsinger L.J., Lamb R.A.** (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, **69**, 517-528.
- Pleschka S., Jaskunas S.R., Engelhardt O. G., Zurcher T., Palese P., Garsia-Sastre A.** (1996). A Plasmid-Based Reverse Genetics System for Influenza A Virus. *J Virol*, **70**, 4188-4192.
- Plotch S.J., Tomasz J., Krug R.M.** (1978). Absence of detectable capping and methylating enzymes in influenza virions. *J Virol*, **28**, 75-83.
- Poch O., Sauvaget I., Delarue M., Tordo N.** (1989). Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J*, **8**, 3867-3874.
- Poole E.L., Elton D., Medcalf L., Digard P.** (2004). Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology*, **321**, 120–133.
- Poole E.L., Medcalf L., Elton D., Digard P.** (2007). Evidence that the C-terminal PB2-binding region of the influenza A virus PB1 protein is a discrete α -helical domain. *FEBS Lett*, **581**, 5300–5306.
- Poon L.L., Pritlove D.C., Sharps J., Brownlee G.G.** (1998). The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J Virol*, **72**, 8214-8219.

Reid A.H., Fanning T.G., Hultin J.V., Taubenberger J.K. (1999). Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1651-1656.

Reid, A.H. Taubenberger J.K., Fanning T.G. (2001). The 1918 Spanish influenza: integrating history and biology. *Microbes Infect*, **3**, 81–87.

Robertson J.S. (1979). 5' and 3' terminal nucleotide sequence of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res*, **6**, 3745-3757.

Robertson J.S., Schubert M., Lazzarini R.A. (1981). Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *J Virol*, **38**, 157-163.

Ruigrok R.W., Baudin F. (1995). Structure of influenza virus ribonucleoprotein particles. II. Purified RNA-free influenza virus ribonucleoprotein forms structures that are indistinguishable from the intact influenza virus ribonucleoprotein particles. *J Gen Virol*, **76**, 1009-1104.

Russel R.J. Kerry P.S., Stevens D.J., Steinhauer D.A., Martin S.R., Gamblin S.J., Skehel J.J. (2008). Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *PNAS* **105**, 17736-17741.

Sanz-Ezquerro J.J., Zurcher T., de la Luna S., Ortin J., Nieto A. (1996). The Amino-Terminal One-Third of the Influenza Virus PA Protein Is responsible for the Induction of Proteolysis. *J Virol*, **70**, 1905-1911.

Sanz-Ezquerro J.J., Santaren J.F., Sierra T., Aragon T., Ortega J., Ortin J., Smith G.L., Nieto A. (1998). The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol*, **79**, 47-478.

Scholtissek C., Becht H. (1971). Binding of ribonucleic acids to the RNP-antigen protein of influenza viruses. *J Gen Virol*, **10**, 11-16.

Skehel J.J., Bayley P.M., Brown E.B., Martin S.R., Waterfield M.D., White J.M., Wilson I.A., Wiley D.C. (1982). Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 968-972.

Skehel J.J., Wiley D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, **69**, 31-69.

Sidorenko Y., Reichl U. (2003). Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotec Bioeng*, **88**, 1-14.

Sidwell R.W., Huffman J.H., Khare G.P., Allen L.B., Witkowski J.T., Robins R.K. (1972). Broad-spectrum antiviral activity of virazole. *Science*, **177**, 705-706.

Sidwell R.W., Smee D.F., Huffman J.H., Barnard D.L., Morrey J.D., Bailey K.W., Feng W.C., Babu Y.S., Bush K. (2001). Influence of viru strain, challeng dose, and time

of therapy initiation on the in vivo influenza inhibitory effects of RWJ-270201. *Antiviral Res*, **51**, 179-187.

Sidwell R.W., Bailey K.W., Wong M.H., Barnard D.L., Smee D.F. (2005). In vitro and in vivo influenza virus-inhibitory effects of viramidine. *Antiviral Res*, **68**, 10-17.

Sleeman K., Mishin V.P., Deyde V.M., Furuta Y., Klimov A.I., Gubareva L.V. (2010). In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**, 2517-2524.

Steinhauer D.A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, **258**, 1-20.

Su C.Y., Cheng T.J., Lin M.I., Wang S.Y., Huang W.I., Lin-Chu S.Y., Chen Y.H., Wu C.Y., Lai M.M., Cheng W.C., Wu Y.T., Tsai M.D., Cheng Y.S., Wong C.H. (2010). High-throughput identification of compounds targeting influenza RNA-dependent RNA polymerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 19151-19156.

Sugiyama K., Obayashi E., Kawaguchi A., Suzuki Y., Tame J.R., Nagata K., Park S.Y. (2009). Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *EMBO J*, **28**, 1803-11.

Sun C., Huang H., Feng M., Shi X., Zhang X., Zhou P. (2006). A novel class of potent influenza virus inhibitors: polysubstituted acylthiourea and its fused heterocycle derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, **16**, 162-166.

Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kasai N., Kawaoka Y. (2006). Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, **440**, 435-436.

Subbarao, K. Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., Perdue M., Swayne D., Bender C., Huang J., Hemphill M., Rowe T., Shaw M., Xu X., Fukuda K., Cox N. (1998). Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, **279**, 393-396.

Tarendeau F., Boudet J., Guilligay D., Mas P.J., Bougault C.M., Boulo S., Baudin F., Ruigrok R.W.H., Daigle N., Ellenberg J., Cusack S., Simorre J.P., Hart D.J. (2007). Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol*, **14**, 229-233.

Tarendeau F., Crepin T., Guilligay D., Ruigrok R.W.H., Cusack S., Hart D.J. (2008). Host determinant Residue Lysine 627 Lies on the Surface of a Discrete, Folded Domain of Influenza Virus Polymerase PB2 Subunit. *PLoS Pathog*, **4**, 1-8.

Taylor R.M. (1949). Studies on survival of influenza virus between epidemics and antigenic variants of the virus. *Am J Public Health Nations Health*, **39**, 171-178.

Tommasini J.E., Davies M.E., Hastings J.C., Lingham R., Mojena M., Raghoobar S.L., Singh S.B., Tkacz J.S., Goetz M.A. (2005). A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 1189-1193.

Toyoda T., Adyshev D.M., Kobayashi M., Iwata A., Ishihama A. (1996). Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J Gen Virol*, **77**, 2149-2157.

Triana-Baltzer G.B., Gubareva L.V., Klimov A.I., Wurtman D.F., Moss R.B., Hedlund M., Larson J.L., Belshe R.B., Fang F. (2009). Inhibition of Neuraminidase Inhibitor-Resistant Influenza Virus by DAS181, a Novel Sialidase Fusion Protein. *PLoS One*, **4**, e7838.

Van Hoeven N., Pappas C., Belser J.A., Maines T.R., Zeng H., García-Sastre A., Sasisekharan R., Katz J.M., Tumpey T.M. (2009). Human HA and polymerase subunit PB2 proteins confer transmission of an avian influenza virus through the air. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 3366-3371.

Wandinger-Ness A., Bennett M.K., Antony C., Simons K. (1990). Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J Cell Biol*, **111**, 987-1000.

Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*, **56**, 152-179.

Webster R.G., Rott R. (1987). Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell*, **50**, 665-666.

Wilson N., Barker M.G. (2009). The emerging influenza pandemic: estimating the case fatality ratio. *European communicable disease bulletin*, **14**, 11-14.

Wright, P.F., Webster, R.G. (2001) Orthomyxoviruses. In *Fields Virology* (4th edition) (Knipe, D.M. and Howley, P.M., eds), pp. 1533–1579, Lippincott Williams & Wilkins.

Wise H., Foeglein A., Sun J., Dalton R.M., Patel S., Howard W., Anderson E.C., Barclay W.S., Digard P. (2009). A Complicated Message: Identification of a Novel PB1-Related Protein Translated from Influenza A Virus Segment 2 mRNA. *J Virol*, **83**:8021–8031.

Wunderlich K., Mayer D., Ranadheera C., Holler A.S., Manz B., Martin A., Chase G., Tegge W., Frank R., Kessler U., Schwemmler M. (2009). Identification of a PA-Binding Peptide with Inhibitory Activity against Influenza A and B Virus Replication. *PLoS One*, **4**, 1-10.

Yasuda J., Nakada S., Kato A., Toyoda T., Ishihama A. (1993). Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology*, **196**, 249-255.

Ye Q., Krug R.M., Tao Y.J. (2006). The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature*, **444**: 1078-1082.

Yuan P., Bartlam M., Lou Z., Chen S., Zhou J., He X., Lv Z., Ge R., Li X., Deng T., Fodor, Zihao E., Liu Y. (2009). Crystal structure of an avian influenza polymerase PAN reveals an endonuclease active site. *Nature*, **458**, 909-913.

Zamarin D., Ortigoza M. B., Palese P. (2006). Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol*, **80**, 7976–7983.

Zhang W., Wang C.Y., Yang S.T., Qin C., Hu J.L., Xia X.Z. (2009). Inhibition of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 replication by the small interfering RNA targeting polymerase A gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **390**, 421-426.

Zhao H., Ekström M., Garoff H. (1998). The M1 and NP proteins of influenza A virus form homo- but not heterooligomeric complexes when coexpressed in BHK-21 cells. *J Gen Virol*, **79**, 2435-46.

Zhou K., He H., Wu Y., Duan M. (2008). RNA interference of avian influenza virus H5N1 by inhibiting viral mRNA with siRNA expression plasmids. *J Biotechnol*, **135**, 140-144.

Zurcher T., de la Luna S., Sanz-Ezquerro J.J., Nieto A., Ortin J. (1996). Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant. *J Gen Virol*, **77**, 1745-1749.

Zvonarjev A.Y., Ghendon Y.Z. (1980). Influence of membrane (M) protein on influenza A virus virion transcriptase activity in vitro and its susceptibility to rimantadine. *J Virol*, **33**, 583-586.

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto il Prof. G. Palù per avermi dato l'opportunità di svolgere il dottorato presso il Dipartimento di Microbiologia.

Ringrazio la Prof.ssa Arianna Loregian per avermi seguito in questi anni e per avermi trasmesso passione, impegno e costanza che ci vogliono per fare bene e con passione questo lavoro.

Ringrazio Beatrice, Elisa, Silvana e Teresa per il sostegno e per condividere ogni giorno la vita di laboratorio.