

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

DOTTORATO DI RICERCA IN VIROLOGIA E BIOTECNOLOGIE MICROBICHE XXI CICLO

Ruolo delle proteine del tegumento nelle interazioni tra il virus dell'*Herpes simplex* di tipo1 e il *pathway* dei *Multivesicular bodies*

Coordinatore : Ch.mo Prof. Giorgio Palù **Supervisore :** Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Dottorando : Dott.ssa Alessandra Comin

INDICE

1.1	SOMMARIO	5
1.2	SUMMARY	7
2.	INTRODUZIONE	9
2.1	Il virus dell'Herpes simplex di tipo 1 (HSV-1)	9
2.2	Il ciclo replicativo di HSV-1	13
2.3	Il tegumento di HSV-1	17
2.3.1	VP1/2	18
2.3.2	VP16	20
2.3.3	VP11/12, VP13/14 e VP22	21
2.4	Il pathway dei multivesicular bodies (MVB)	22
2.5	Il <i>pathway</i> dei <i>multivesicular bodies</i> e la gemmazione dei virus a RNA dotati di <i>envelope</i>	27
2.5.1	Late domain virali	28
2.5.2	Ubiquitinazione	30
3.	SCOPO	33
4.	MATERIALI E METODI	35
MATERIALI		35
4.1	Linee cellulari	35
4.2	Ceppi virali	35
4.3	Plasmidi	36
4.4	Oligonucleotidi innesco	39
METODI		42
4.5	Tecniche di biologia molecolare	42
4.5.1	Preparazione del DNA plasmidico	42
4.5.2	Restrizioni enzimatiche	43

4.5.3	Tecniche di clonaggio	43
4.5.4	Competenza e trasformazione batterica	45
4.5.5	Reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR)	46
4.5.6	Mutagenesi sito-specifica	47
4.5.7	Sequenziamento di plasmidi	48
4.6	Tecniche di biologia cellulare	49
4.6.1	Tecniche di trasfezione	49
4.6.2	Preparazione e titolazione di stock virali di HSV-1	50
4.6.3	Infezione di colture cellulari con HSV-1	50
4.6.4	Immunoprecipitazione (IP)	51
4.6.5	Co-immunoprecipitazione (Co-IP)	52
4.6.6	SDS-gel elettroforesi	52
4.6.7	Immunoblotting	53
4.6.8	Immunocitofluorescenza indiretta	54
5.	RISULTATI	57
5.1	Premessa	57
5.2	Identificazione di Late domain nelle proteine del tegumento di HSV-1	58
5.3	Ottenimento di costrutti esprimenti le forme tronche di VP1/2: pcDNAUL36 ₁₋₁₅₉₉ 5'Flag e pcDNAUL36 ₁₋₂₃₀₁ 5'Flag	59
5.4	Localizzazione intracellulare di VP1/2 ₁₋₅₃₃ 5'Flag e VP1/2 ₁₋₇₆₇ 5'Flag mediante immunocitofluorescenza indiretta	61
5.5	Analisi delle interazioni di VP1/2 ₁₋₇₆₇ 5'Flag con i corrispondenti <i>partner</i> cellulari: Tsg101 ed AIP1	63
5.6	Ottenimento del costrutto esprimente VP1/2 5'Flag: pcDNAUL36 5'Flag	64
5.7	Localizzazione intracellulare di VP1/2 5'Flag mediante immunocitofluorescenza indiretta	66

5.8	Analisi delle interazioni di VP1/2 5'Flag con Tsg101HA	67
5.9	Valutazione degli effetti delle mutazioni del dominio PSAP di VP1/2 ₁₋₇₆₇ 5'Flag nell'interazione con Tsg101HA	68
5.10	Localizzazione intracellulare di VP16-GFP mediante immunocitofluorescenza indiretta	70
5.11	Ottenimento dei costrutti esprimenti la proteina VP16 fusa agli epitopi HA o Flag: pBJ5-HAVP16 e pBJ5-FalgVP16	71
5.12	Analisi dell'ubiquitinazione di VP16	72
5.13	Ottenimento dei costrutti esprimenti le proteine VP13/14 e VP22 fuse all'epitopo Flag: pcUL47 5'Flag e pcUL49 5'Flag	74
5.14	Analisi delle interazioni di VP16 5'HA con VP13/14 5'Flag e VP22 5'Flag	76
5.15	Analisi dell'ubiquitinazione di VP22 5'Flag	77
5.16	Analisi dell'ubiquitinazione di VP13/14 5'Flag	78
5.17	Identificazione del residuo di lisina coinvolto nell'ubiquitinazione di VP13/14 5'Flag	80
6.	DISCUSSIONE	83
7.	BIBLIOGRAFIA	93
8.	ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	107
9.	RINGRAZIAMENTI	109
10.	PUBBLICAZIONI ALLEGATE	111

1.1 SOMMARIO

Molti virus dotati di *envelope* completano il proprio ciclo replicativo formando delle vescicole che gemmano attraverso membrane cellulari di varia natura¹⁵, ma la scissione del virione da tali membrane non è un passaggio semplice o spontaneo. Per quel che riguarda diversi virus a RNA, tra cui retrovirus, rabdovirus, filovirus, arenavirus e, presumibilmente, orto- e paramixovirus, tale problema è stato risolto mediante il reclutamento di fattori normalmente utilizzati dalla cellula durante la formazione di vescicole interne a specifici organelli membranosi derivati dagli endosomi: i multivesicular bodies (MVB)^{6, 56}. In effetti, la gemmazione dei virus a RNA dotati di envelope e la formazione delle vescicole interne ai MVB sono processi analoghi: in entrambi i casi si verifica una curvatura della membrana in allontanamento dal citoplasma⁶⁷. Affinché un'infezione possa considerarsi produttiva, quindi, è necessario che tutti i componenti utili alla formazione della particella siano convogliati a livello della membrana in cui si verificherà l'evento di gemmazione¹¹. A questo scopo, i virus a RNA hanno evoluto due possibili strategie: la presenza di particolari sequenze note come Late domain (L-domain) all'interno delle proprie proteine strutturali e/o la loro ubiquitinazione^{21, 56}; in entrambi i casi le proteine coinvolte vengono reclutate nel pathway dei MVB. Molto meno è noto, invece, per quel che riguarda gli herpesvirus e, più in generale, i virus a DNA dotati di envelope. Infatti, se da un lato le fasi iniziali dell'infezione erpetica sono piuttosto conosciute, dall'altro rimangono aperte alcune controversie riguardanti il sito cellulare di assemblaggio e acquisizione del pericapside nonché la natura delle membrane implicate nella gemmazione della particella virale dalla cellula infetta⁵⁴.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di contribuire al chiarimento dei meccanismi molecolari dell'assemblaggio e della gemmazione degli herpesvirus, prendendo come modello il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1). In particolar modo, due lavori pubblicati nell'ultimo periodo hanno evidenziato un possibile ruolo dei MVB nel ciclo replicativo di HSV-1 sottolineando l'importanza di una corretta biogenesi di tali organelli per garantire la gemmazione virale e il corretto *trafficking* intracellulare di una proteina virale essenziale, quale la glicoproteina B^{10, 19}. Sulla base di tali riscontri si è deciso di valutare se le membrane dei MVB costituissero il sito di reclutamento di altre importanti proteine strutturali, quali quelle del tegumento, così

da poter identificare tali organelli come il sito di acquisizione del pericapside e di assemblaggio definitivo della particella virale.

Nel presente lavoro ci siamo focalizzati soprattutto su quattro proteine del tegumento di HSV-1: VP1/2, VP13/14, VP16 e VP22. In particolar modo, abbiamo dimostrato che VP1/2 e VP16 presentano al proprio interno sequenze riconducibili a L-domain noti e che sia VP1/2 che VP16 localizzano a livello delle membrane dei MVB. Il reclutamento di VP1/2 a livello di tali organelli può essere attribuito, almeno in parte, all'interazione tra il dominio PSAP in essa contenuto e la proteina Tsg101, suo partner cellulare, con cui abbiamo dimostrato l'associazione. Viceversa, le cause della localizzazione di VP16 non sono altrettanto chiare. Infatti, abbiamo dimostrato che VP16 non presenta alcuna interazione diretta tra il dominio PPLY in essa presente e i corrispondenti partner cellulari, i membri della famiglia delle ubiquitinoligasi Nedd4. Inoltre, in base ai nostri dati, la medesima proteina non risulta nemmeno ubiquitinata, modifica post-traduzionale che ne garantirebbe il direzionamento ai MVB. Nell'ipotesi che il suo reclutamento ai MVB sia di tipo indiretto e dovuto all'azione di altre proteine virali, abbiamo quindi verificato alcune tra le interazioni riportate in letteratura per quel che riguarda VP16 e le altre proteine del tegumento, in particolare VP13/14 e VP22. Dai nostri esperimenti è emerso che VP16 interagisce direttamente con VP22, in assenza di altri fattori virali, ma non con VP13/14. Tuttavia, nemmeno il legame con VP22 è risultato tale da giustificare la localizzazione intracellulare di VP16, che quindi potrebbe richiedere fattori virali e/o cellulari diversi da quelli analizzati. Infine, mediante studi più approfonditi su VP22 e VP13/14, abbiamo dimostrato che entrambi tali proteine risultano ubiquitinate e che, nel caso specifico di VP13/14, tale ubiquitinazione è del tipo generalmente responsabile del direzionamento di una proteina al *pathway* dei MVB.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che almeno quattro proteine del tegumento sono effettivamente reclutate ai MVB o possiedono le caratteristiche necessarie ad una simile localizzazione, quali la presenza di *L-domain* o la coniugazione all'ubiquitina. E' quindi possibile supporre che tali organelli, oltre a rappresentare una potenziale via d'uscita dalla cellula infettata, possano fornire anche la "piattaforma" cellulare adatta al completamento dell'assemblaggio del tegumento e all'acquisizione del pericapside da parte della particella virale.

1.2 SUMMARY

Many enveloped viruses complete their replication cycle by forming vesicles that bud from cellular membranes of different origin¹⁵, but separation of virion from host membranes is not a trivial or spontaneous step. Several enveloped RNA viruses, such as retroviruses, rhabdoviruses, filoviruses, arenaviruses, and, probably, also orthoand paramyxoviruses, solve such a problem by coopting factors that cells usually employ during the formation of vesicles within specific endosome-derived organelles: the multivesicular bodies (MVBs)^{6, 56}. Actually, enveloped RNA viruses budding and formation of MVBs intraluminal vesicles are analogous processes: in both cases membranes must curve and bud away from (rather than into) the cytoplasm⁶⁷. Indeed, a productive infection requires that all the components necessary for the formation of infectious particles localize to the membrane at the site where budding will take place¹¹. To that end, RNA viruses evolved two possible strategies: the presence of special sequences named Late domains (L-domains) in their structural proteins and/or their ubiquitylation^{21, 56}. In any case proteins involved are recruited to the MVBs pathway. Much less is known about herpesviruses and, in general, enveloped DNA viruses. In fact, even if the initial steps of the herpetic infection are quite well-known, the cellular site of assembly and pericapsid's acquisition as well as the nature of the membranes involved in viral budding are not clear yet⁵⁴.

The aim of this work was to elucidate the molecular mechanisms behind essential steps of herpesvirus replication, such as assembly and budding from infected cells. In particular, we used the α -herpesvirus HSV-1 as a model. Two recent works pointed out a possible role of MVBs in HSV-1 replication: both virus egress and intracellular trafficking and maturation of the essential glycoprotein gB require functional biogenesis of MVBs^{10, 18}. On the basis of those considerations, we evaluated whether MVBs membranes could be the recruiting site of other main structural proteins, such as the tegumental ones, in order to identify those organelles as the pericapsid's acquisition and final assembly site of the viral particles.

Most of all, we focused on four HSV-1 tegumental proteins: VP1/2, VP13/14, VP16 and VP22. Especially, we observed that both VP1/2 and VP16 possess sequences belonging to the L-domains motifs and that both VP1/2 and VP16 localize at the MVBs membranes. We also proved the interaction between the PSAP motif of the

protein and Tsg101, its cellular partner. We supposed that the recruitment of VP1/2 to the MVBs can be due, at least partially, to such interaction. Vice versa, the reason for the localization of VP16 are not as clear. We demonstrated that VP16 does not show any direct interactions between its PPLY motif and the corresponding cellular partners, the members of the Nedd4 ubiqutin-ligases family. Moreover, our data revealed that VP16 is not even ubiquitylated, a post-translational modification that would ensure its sorting to the MVBs. Supposing that its recruitment to the MVBs was indirect and due to other viral proteins, we verified two of the interactions ascribed to VP16 and other tegument proteins in the literature, especially those related to VP13/14 and VP22. We confirmed that VP16 direct interacts with VP22, in the absence of other viral factors, but not with VP13/14. Still, that interaction did not explain the intracellular localization of VP16 that could require viral and/or cellular factors other than those examined. Last, by a deeper investigation of both VP22 and VP13/14, we demonstrated that each of those proteins is ubiquitylated and that the ubiquitylation of VP13/14 is specific for the targeting to the MVBs pathway. Concluding, our data showed that at least four HSV-1 tegumental proteins are recruited to the MVBs or own the necessary features for such an intracellular localization, that are L-domains or ubiquitin conjugation. So it is possible to suppose that MVBs could provide the appropriate platform for the tegument assembly and the acquisition of the pericapsid as well as a possible exit from the infected cell.

2. INTRODUZIONE

2.1 Il virus dell'Herpes simplex di tipo 1 (HSV-1)

La famiglia degli *Herpesviridae* comprende numerosi virus a DNA accomunati da specifiche proprietà biologiche e morfologiche⁷⁶. In generale, un herpesvirus è costituito da quattro distinte componenti strutturali: un *core* contenente un genoma a DNA lineare a doppio filamento, un capside icosaedrico di circa 100-110 nm di diametro, una complessa struttura proteica definita tegumento e, infine, un *envelope* lipidico di origine cellulare contenente numerose glicoproteine virali^{53, 76}. Tra gli oltre 130 herpesvirus in grado di infettare una o più specie animali, solamente nove sono stati isolati dall'uomo: gli herpes simplex virus di tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), il virus della varicella zoster (VZV), il citomegalovirus umano (HCMV), il virus di Epstein-Barr (EBV) e gli herpesvirus umani 6A, 6B, 7 e 8 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7 e HHV-8)⁷⁵.

Sulla base delle loro proprietà biologiche e di omologie di sequenza nel DNA virale, gli herpesvirus vengono suddivisi in tre sottofamiglie: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae⁷³. Entrambi i tipi di herpes simplex appartengono alla prima categoria. Le infezioni causate da tali virus, caratterizzate dall'alternarsi di periodi di latenza e riattivazioni, interessano diversi distretti tra cui, in particolar modo, le superfici muco-cutanee orali e oculari (HSV-1), quelle genitali (HSV-2), il sistema nervoso e, occasionalmente, gli organi viscerali. L'infezione primaria si sviluppa mediante contatto diretto di una superficie mucosa o di una ferita cutanea in individui sieronegativi con secrezioni contenenti particelle virali in individui infetti. I virioni formatisi a livello delle terminazioni sensoriali periferiche, sede della replicazione virale, vengono trasportati mediante flusso assonale retrogrado fino ai gangli dorsali, sede della latenza di HSV. Opportuni stimoli possono causare la riattivazione del ciclo replicativo e la ricomparsa del virus a livello muco-cutaneo dove l'infezione si manifesta in forma di vescicole o ulcere. Più raramente l'infezione può diffondere oltre i gangli dorsali divenendo sistemica, soprattutto nel caso di soggetti immunosoppressi o in età neonatale.

Sebbene l'uomo rappresenti l'ospite naturale per i virus dell'herpes simplex, la suscettibilità all'infezione può estendersi anche ad una gamma relativamente ampia di animali tra cui topi, cavie, criceti e conigli. Molti tipi cellulari costituiscono un

substrato per questi tipi di virus e, una volta infettate, le cellule vanno incontro ad estesi effetti citopatici sviluppando corpi d'inclusione intranucleari con possibile comparsa di rotture o aberrazioni cromosomiche. In particolare, l'infezione causa alterazioni strutturali e morfologiche¹³ finalizzate a rendere la cellula un microambiente ottimale per la replicazione e il rilascio di HSV-1¹⁰. La risposta cellulare, strettamente dipendente dal ceppo virale considerato, può variare da una spiccata aggregazione delle cellule coinvolte alla formazione di tipiche placche di lisi. Il ciclo replicativo virale in tutta la sua complessità richiede in totale circa 18-20 ore al termine delle quali la cellula sede d'infezione produttiva muore mediante lisi. Tuttavia gli *Alphaherpesvirinae*, pur essendo estremamente litici, stabiliscono infezioni latenti riattivabili nei loro ospiti naturali e, probabilmente, questo fenomeno è responsabile della loro trasmissione e del loro mantenimento in natura⁷⁴.

Il virione di HSV-1 presenta tutti gli elementi strutturali caratteristici degli herpesvirus. Un *core* elettron-denso contenete il DNA genomico in forma di toroide, un capside icosaedrico costituito da 150 esoni e 12 pentoni, un tegumento particolarmente complesso e un *envelope* lipidico di origine cellulare da cui protrudono diverse glicoproteine⁵³ (Fig. 1).



Figura 1A. Rappresentazione schematica del virione di HSV-1 (immagine tratta da <u>http://hub.med.uth.tmc.edu/-hong/image.html</u>). 1B. Immagine al microscopio elettronico del virione di HSV-1 (immagine fornita dal Dr. E. Wagner, Università della California, USA).

Il DNA genomico, rappresentato da un doppio filamento lineare di almeno 152 kilobasi particolarmente ricco in G-C (68%), è costituito da due diversi frammenti legati covalentemente e denominati *Long* o L e *Short* o S. Ciascuna componente presenta sequenze uniche (U_L e U_S rispettivamente) affiancate da sequenze ripetute invertite (ab e a'b' nel caso di U_L e a'c' e ac nel caso di U_S)²⁰. Le componenti L e S, a propria volta, possono essere invertite una rispetto all'altra dando origine a quattro diversi isomeri⁷⁵ (Fig. 2).

Figura 2. Rappresentazione schematica dell'organizzazione del genoma di HSV-1. U_L: sequenza unica L. U_S: sequenza unica S. $a_L e a_S$: sequenze terminali uniche ripetute. $a_m e a_n$: sequenze terminali uniche ripetute presenti in una o più copie o in zero o più copie rispettivamente.

Il genoma di HSV-1, la cui lunghezza varia da ceppo a ceppo, codifica almeno 84 diversi polipeptidi¹⁰² i cui geni possono essere presenti in una o più copie a seconda che mappino all'interno delle regioni uniche o ripetute. Nei virioni purificati sono state identificate almeno una quarantina di tali proteine di cui 7 nel capside, 21 nel tegumento e 11 o più nell'envelope^{54, 101}. In seguito all'entrata del virus nelle cellule il DNA di HSV-1, normalmente impacchettato in forma di toroide nel core, circolarizza, probabilmente grazie all'intervento di proteine cellulari o virali presenti negli stessi virioni. Nel nucleo della cellula infetta, la replicazione del DNA virale inizia con modalità theta origine-dipendente per proseguire successivamente mediante un meccanismo a "cerchio rotante" origine-indipendente che porta alla formazione di lunghi concatameri⁸³. Il DNA concatamerico neo-sintetizzato viene quindi scisso in corrispondenza di sequenze di riconoscimento specifiche e impacchettato nei capsidi preformati. Nel nucleo cellulare ha luogo anche la trascrizione dei geni virali mediante un meccanismo a cascata altamente coordinato portato a termine dall'RNA polimerasi II cellulare. In base alla cinetica di espressione è possibile distinguere tre diverse categorie di geni:

 I geni α o *immediate early* (IE). La loro trascrizione si verifica in tempi rapidissimi in seguito all'infezione (2-4 ore) e in totale assenza di proteine virali neo-sintetizzate. A questa categoria di geni corrispondono le proteine ICP (*infected cell polypeptide*) 0, 4, 22, 27 e US1.5, ciascuna con funzioni regolative essenziali per la sintesi dei gruppi proteici successivi. Ai prodotti di espressione dei geni α , infine, appartiene anche la proteina ICP47, la quale, bloccando il trasporto dei peptidi antigenici nel reticolo endoplasmatico dove avviene la loro interazione con le proteine del complesso maggiore d'istocompatibilità, contribuisce ai meccanismi adottati da HSV-1 per eludere il sistema immunitario dell'ospite.

- 2. I geni β o *early* (E). L'espressione di questi geni, il cui picco si verifica a 4-8 ore dall'inizio dell'infezione, necessita della presenza della proteina α ICP4. I geni β codificano due tipologie di proteine indicate come β_1 e β_2 cui va attribuita la replicazione del DNA virale, il metabolismo dei nucleotidi e la regolazione dell'espressione dei geni γ . Le prime vengono espresse immediatamente dopo o addirittura quasi in concomitanza con i geni α e sono esemplificate dai prodotti proteici ICP8 (una proteina che lega il DNA a singolo filamento) e ICP6 (la subunità maggiore costituente la ribonucleotide reduttasi virale). Le proteine β_2 invece vengono espresse in tempi successivi ed includono la timidina chinasi e la DNA polimerasi virali.
- 3. I geni γ o late (G). La loro espressione ha inizio in seguito alla sintesi del DNA virale ed è potenziata proprio da tale processo. Le proteine codificate dai geni γ sono prevalentemente proteine strutturali del capside, del tegumento e dell'*envelope* e a propria volta sono state suddivise in due diverse categorie denominate γ_1 e γ_2 . Alle prime appartengono proteine espresse relativamente presto durante l'infezione la cui sintesi aumenta in modo consistente in seguito alla replicazione del DNA virale. Tra queste vi sono VP5 (la proteina capsidica maggiore) e le glicoproteine gB e gD. Le proteine γ_2 invece compaiono solo nelle fasi tardive dell'infezione e la presenza di inibitori della sintesi del DNA virale causa l'arresto della loro espressione. Fanno parte di questo gruppo la glicoproteina gC, le proteine del tegumento VP1/2, VHS (virion host shutoff) e US11.

La regolazione della trascrizione genica di HSV-1, infine, è un fenomeno molto complesso che può verificarsi a più livelli:

 trascrizionale, in quanto il genoma di HSV-1 contiene diverse sequenze agenti in *cis* che vengono riconosciute e interagiscono con fattori trascrizionali sia cellulari che virali, tra cui i prodotti dei geni α ICP0, ICP4 e la proteina del tegumento VP16.

- 2. post-trascrizionale, mediante il processamento degli mRNA e il loro trasporto dal nucleo al citoplasma.
- 3. traduzionale, basata sull'interazione degli mRNA con proteine cellulari e virali.

2.2 Il ciclo replicativo di HSV-1

L'infezione di HSV-1 ha inizio con l'attacco del virione alla superficie della cellula bersaglio mediato dall'interazione delle glicoproteine gB e gC con l'eparansolfato cellulare^{86, 106} e della glicoproteina gD con tre possibili tipologie di proteine: le glicoproteine di adesione cellulare nectina-1 e nectina-2, il recettore HVEM (*herpesvirus entry mediator*) e l'eparansolfato modificato dall'enzima 3-O-sulfotransferasi⁹². In base alle teorie più recenti, l'interazione di gD con l'appropriato recettore cellulare implica una variazione conformazionale della glicoproteina stessa che ne rende accessibile il dominio di profusione. A tale evento segue un nuovo coinvolgimento della glicoproteina gB che, mediante opportuni cambiamenti conformazionali, attiva l'eterodimero fusogeno formato dalle glicoproteine gH e gL con conseguente fusione tra l'*envelope* virale e la membrana cellulare³¹.

Una volta penetrato nel citoplasma, il nucleocapside associato alle proteine del tegumento viene trasportato al nucleo lungo i microtubuli⁹⁰. Durante il trasporto alcune proteine del tegumento tra cui VP16 e VHS vengono rilasciate, mentre altre, tra cui VP1/2, ICP32 e US3 rimangono associate al capside⁵⁴. Il capside, quindi, si lega ai pori nucleari e, grazie all'intervento di particolari proteine cellulari quali l'importina β e la Ran GTPasi⁶³, il DNA virale entra nel nucleo sede della sua replicazione e trascrizione. In questo contesto, per garantire il rilascio del DNA virale dal capside⁴², sembra assumere importanza primaria il taglio proteolitico di VP1/2, una proteina strettamente legata alla proteina capsidica VP5 a livello dei pentoni¹⁰⁸. In seguito all'espressione genica virale e alla sintesi del DNA, le proteine capsidiche neo-sintetizzate sono ritraslocate dal citoplasma al nucleo dove, mediante interazione tra i prodotti genici di UL19 e UL6 e una struttura base costituita dalle proteine UL26 e UL26.5, si assemblano in modo autocatalitico producendo capsidi preformati in cui verrà impacchettato il DNA⁴.

Secondo i modelli più recenti, il ciclo replicativo di HSV-1 è caratterizzato da due distinti eventi di gemmazione e fusione che coinvolgono compartimenti subcellulari

e proteine differenti⁵⁴. I capsidi contenenti il genoma gemmano attraverso la membrana nucleare interna acquisendo un primo envelope in un processo definito primary envelopment. Il movimento intranucleare dei nucleocapsidi dipende dall'actina, mentre la gemmazione a livello della membrana nucleare interna è possibile grazie ad una parziale dissoluzione della lamina ad opera della protein chinasi cellulare C reclutata dai prodotti genici di UL31 e UL34⁶⁶ e, in parte, della protein chinasi virale codificata dal gene US3⁸⁷ anche se, finora, non sono mai state identificate proteine capsidiche che interagiscano direttamente con la membrana nucleare interna così da dare inizio a tale processo. Analisi di microscopia immunoelettronica hanno evidenziato che i virioni dotati di envelope primario differiscono notevolmente dalle particelle mature, sia in termini di morfologia che di contenuto proteico³³. Infatti, i primi da un lato presentano i prodotti genici di UL31 e UL34, assenti nei virioni maturi, e dall'altro sono privi di alcune delle principali proteine tegumentarie presenti in questi ultimi, quali i prodotti genici di UL46 e UL47⁷¹, o le possiedono in quantità differenti, come nel caso del prodotto genico di UL48 (VP16)⁶⁰. Al momento l'unica proteina condivisa dalle due tipologie di virioni sembra essere la protein chinasi virale codificata da US3.

Il passaggio successivo nel processo di maturazione prevede che i capsidi accedano al citoplasma mediante fusione dell'*envelope* primario con la membrana nucleare esterna. Il meccanismo che sottende tale fase non è ancora stato chiarito dal momento che nessuna delle glicoproteine essenziali durante la penetrazione virale sembra essere coinvolta durante la gemmazione nucleare^{12, 55}. Tuttavia, nei mutanti privi di US3 si verifica un accumulo di virioni dotati di *envelope* primario a livello della membrana nucleare interna, ragion per cui la fosforilazione di un componente di tali particelle ad opera della chinasi virale potrebbe rappresentare uno degli elementi d'innesco di tale fusione^{55, 70}. Inoltre, studi eseguiti con mutanti privi di VP16, evidenziano un accumulo di capsidi dotati di *envelope* primario nello spazio perinucleare, sottintendendo un possibile ruolo di tale proteina durante la fusione⁵⁸. Una volta raggiunto il citoplasma, una serie estremamente ordinata di interazioni proteina-proteina guida la formazione definitiva del tegumento e l'acquisizione dell'*envelope* secondario (Fig. 3).



Figura 3. Rappresentazione schematica del ciclo replicativo di HSV-1. Nell'immagine sono evidenziabili le fasi d'ingresso, replicazione e trascrizione del genoma virale, maturazione ed uscita del virus dalla cellula ospite (immagine tratta da Coen *et al., Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(4): 278-88).

E' ormai chiaro che l'assemblaggio del tegumento ha inizio in due siti distinti, il capside e il futuro *envelope*, dove si vengono a formare due "sottoassemblaggi" destinati a combinarsi tra loro per produrre il virione maturo⁵⁵. Da un lato i prodotti genici di UL36 e UL37, costituenti lo strato più interno del tegumento insieme alla chinasi virale, si associano al capside al momento del rilascio nel citoplasma, sebbene non sia chiaro se si leghino al nucleocapside durante l'acquisizione dell'*envelope* primario o subito dopo la gemmazione nucleare⁵⁴. Dall'altro, altre proteine facenti parte del tegumento esterno, tra cui i prodotti genici di UL11, UL46, UL47 e UL49⁵⁵ e le glicoproteine virali, tra cui la glicoproteina gM¹⁰⁰, si assemblano a livello delle membrane del trans-Golgi *network*, uno dei possibili siti di acquisizione dell'*envelope* secondario⁹⁷. Tra queste, sia la proteina gM che il prodotto genico di UL11, entrambi conservati all'interno della famiglia degli herpesvirus, risultano fondamentali durante l'assemblaggio. La prima infatti sarebbe in grado di trattenere o richiamare le glicoproteine a livello dell'apparato di Golgi¹⁸,

mentre il secondo non solo presenta proprietà intrinseche di localizzazione per lo stesso organello⁷, con conseguente possibilità di dirigervi le proteine del tegumento, ma risulta interagire direttamente anche con l'estremità C-terminale delle glicoproteine gD e gE che vi si accumulano²⁸. Infine, un'altra interazione fondamentale nella maturazione dei virioni di HSV-1² sembra essere quella tra la proteina tegumentaria derivante dall'espressione di UL20 e la glicoproteina gK, il cui corretto processamento dipende proprio da tale interazione²⁹. Infatti, evidenze sperimentali indicano che, virus ricombinanti privi dell'eterodimero costituito dal prodotto genico di UL20 e dalla proteina gK, non gemmano accumulandosi all'interno delle vescicole del trans-Golgi⁴¹. Le interazioni tra le numerose proteine del tegumento sia con il nucleocapside che con le code citoplasmatiche delle glicoproteine costituirebbero quindi l'elemento trainante necessario all'assemblaggio del virione maturo e alla successiva acquisizione dell'envelope secondario. In particolare, in seguito alla gemmazione nucleare, i capsidi intracitoplasmatici si assocerebbero ai prodotti genici di UL36 e UL37 che ne medierebbero il trasporto fino al sito di acquisizione dell'envelope dove le glicoproteine e le rimanenti proteine del tegumento vengono radunate ad opera rispettivamente della glicoproteina gM e del prodotto del gene UL11⁵⁵. Pur non essendo chiaro quali proteine fungano da elemento di congiunzione tra i due "sottoassemblaggi", un buon candidato sembra essere rappresentato da VP16. Infatti, sebbene non siano state rilevate interazioni dirette tra tale proteina e le proteine del capside o le proteine del tegumento interno, tuttavia sono state riportate interazioni di tipo fisico con i prodotti genici di UL49²⁶, UL41⁸⁸ e con la coda citoplasmatica della glicoproteina gH³⁴ e di tipo funzionale con i prodotti genici di UL46 e UL47¹⁰⁷. Inoltre in assenza di VP16 l'acquisizione dell'envelope secondario è fortemente inibita e i nucleocapsidi si accumulano nel citoplasma⁵⁸.

Una volta terminato l'assemblaggio del tegumento, il virione acquisisce il proprio *envelope* definitivo, in un processo definito *secondary envelopment*, a livello di membrane appartenenti all'apparato di Golgi, al *trans*-Golgi *network* o a organelli derivanti dagli endosomi tardivi e noti come *multivesicular bodies* (MVB¹⁰). Il risultato finale è la produzione di una particella virale matura contenuta all'interno di una vescicola di origine cellulare che successivamente verrà trasportata alla membrana plasmatica dove il virione verrà rilasciato⁵⁵ (Fig. 4).



Figura 4. Rappresentazione schematica delle fasi finali del ciclo replicativo di HSV-1. In particolar modo è possibile sottolineare la presenza dei due "sottoassemblaggi" di aggregazione delle proteine strutturali a livello del capside e di vescicole membranose derivanti dall'apparato di Golgi (figura tratta da Mettenleiter, *J Virol*, 2002, 76 (4): 1537-47).

In conclusione, il modello di *envelopment* a due tappe propone non solo due eventi di fusione, ma anche due eventi di gemmazione: il primo a livello della membrana nucleare interna con acquisizione da parte del capside di un primo rivestimento lipidico e il secondo a livello delle vescicole di un organello membranoso, non ancora universalmente identificato, con la formazione della particella definitiva.

2.3 Il tegumento di HSV-1

Il tegumento rappresenta la componente più eterogenea e diversificata del virione di HSV-1, sia dal punto di vista strutturale che funzionale, ed è costituito da oltre 20 proteine: VP1/2 (UL36), VP11/12 (UL46), VP13/14 (UL47), VP16 (UL48), VP22 (UL49), ICP0, ICP4, VHS (UL41) e i prodotti genici di US2, US3, US10, US11, UL11, UL13, UL14, UL16, UL17, UL21, UL37, UL51 e UL56.

In primo luogo il tegumento rappresenta l'elemento di continuità tra l'*envelope* e il capside virali e sebbene venga generalmente indicato come amorfo, in realtà a livello dei pentoni, punti di contatto con l'ordinata struttura capsidica¹⁰⁸, anche le proteine del tegumento interno assumono un'organizzazione icosaedrica⁷². Il ruolo di "collante" svolto dal tegumento è possibile grazie a numerose interazioni delle sue

proteine tra loro, con i polipeptidi costituenti il capside e con le code citoplasmatiche delle glicoproteine dell'*envelope*. In particolar modo in letteratura sono riportate le seguenti interazioni^{16, 84, 101, 109}:

- Tegumento-capside: UL36-VP5, UL36-UL25
- Tegumento-tegumento: US11-US11, UL11-UL16, UL17-UL25, UL17-UL46-UL47, UL36-UL37, UL37-UL37, UL41-UL48, UL46-UL48, UL47-UL48, UL48-UL49, UL49-UL49, ICP0-ICP4
- Tegumento-*envelope*: UL48-gB, UL48-gD, UL48-gH, UL49-gD, UL49-gE, UL49-gM

Tra le numerose proteine che costituiscono il tegumento, alcune, tra cui i prodotti genici di UL36 e UL48, risultano essenziali per l'assemblaggio e/o il ciclo replicativo di HSV-1, mentre altre possono essere delete senza alterare in modo evidente la struttura del virione⁷², probabilmente a causa dell'elevato grado di ridondanza insito nelle interazioni appena indicate.

In secondo luogo, il tegumento può essere identificato come una struttura che introduce nella cellula infettata fattori virali volti a facilitare l'inizio di un'infezione produttiva. Tra questi, ad esempio, vi sono il transattivatore trascrizionale dei geni α (VP16), la proteina responsabile del silenziamento della sintesi proteica cellulare (VHS)²³, la protein-chinasi virale (UL13)⁶⁴, proteine che interagiscono con i ribosomi (UL11)⁷⁷ e proteine coinvolte nell'impacchettamento del DNA virale nel nucleocapside (UL17)⁷⁹.

2.3.1 VP1/2

La proteina VP1/2, codificata dal gene UL36, costituisce, insieme alla proteina codificata dal gene UL37, il tegumento interno di HSV-1 che, come precedentemente accennato, risulta strettamente associato al capside virale. In particolar modo sarebbe proprio VP1/2 ad ancorare saldamente il tegumento alla proteina VP5 posizionata ai vertici capsidici, anche se, recentemente, è stato ipotizzato che anche le proteine codificate dai geni UL17 e UL25 possano essere coinvolte in questo legame⁹⁹. Sebbene non sia chiaro dove VP1/2 e il prodotto genico di UL37 vengano

incorporate nel virione, tuttavia alcuni studi hanno evidenziato che tali proteine sono associate al capside già a livello del nucleo cellulare⁹.

Con i suoi oltre 3 mila aminoacidi, VP1/2 rappresenta la più grande proteina codificata da HSV-1 e presenta una massa teorica pari a 366 kDa, anche se, in base alla sua mobilità elettroforetica, la massa apparente risulta pari a 270 kDa⁹¹. Nelle fasi tardive della replicazione virale VP1/2 subisce un taglio proteolitico alla propria estremità N-terminale che porta al rilascio di un frammento di circa 500 aminoacidi con attività ubiquitin-proteasica specifica rivolta all'idrolisi del legame basato sul residuo di lisina 48 dell'ubiquitina. La sequenza codificante tale cistein-proteasi è conservata in tutti gli omologhi di UL36 all'interno della famiglia degli Herpesviridae e pertanto potrebbe avere un ruolo rilevante nel ciclo replicativo virale⁴⁴. In realtà il frammento appena descritto non è l'unico ad essere originato a partire da VP1/2. Recentemente infatti è stato dimostrato che un ulteriore taglio proteolitico, che si verifica sempre a carico dell'estremità N-terminale della proteina, porta alla formazione di un secondo frammento con una massa pari a 55 kDa. Tuttavia, a differenza del precedente, tale frammento viene prodotto nelle fasi iniziali dell'infezione, immediatamente in seguito all'attacco del capside ai pori nucleari, e la sua produzione risulta essenziale per il rilascio del DNA virale nel nucleo. Infatti, il taglio proteolitico di VP1/2 causa una variazione conformazionale della proteina che, a propria volta, implica una variazione conformazionale dei pentoni necessaria al rilascio del DNA virale. Non è chiaro quale sia l'enzima responsabile della frammentazione di VP1/2, anche se un possibile candidato potrebbe essere rappresentato dalla serin-proteasi virale codificata dal gene UL26⁴². Infine, VP1/2 risulta fondamentale in almeno altri due passaggi del ciclo replicativo di HSV-1: il trasporto del capside lungo i microtubuli e la maturazione della particella virale. Virioni mutanti deleti di UL36 portano all'accumulo nel citoplasma di particelle immature, prive di envelope, morfologicamente distinte da quelle wild-type, incapaci di migrare lungo i microtubuli, pur legandovisi, e non infettive. L'assemblaggio della particella, seppur più precario, potrebbe essere garantito anche in assenza di VP1/2 grazie alla fitta rete d'interazioni allestite dalle numerose proteine costituenti il tegumento⁸⁴. Tuttavia, risulta evidente che il prodotto genico di UL36 possiede una funzione essenziale per la maturazione del capside e la successiva uscita dalla cellula infetta presumibilmente legata alla capacità di guidare attivamente il capside nel sito

citoplasmatico in cui il virione acquisisce definitivamente il proprio tegumento e il proprio *envelope*²².

2.3.2 VP16

Il prodotto genico di UL48 è una fosfoproteina di 65 kDa nota come VP16 o α -TIF (alpha-trans-inducing factor). Così come altre proteine di HSV-1, VP16 riveste molteplici ruoli fondamentali sia da un punto di vista strutturale che funzionale. Come già accennato, è stato ipotizzato che VP16, grazie alle sue numerose interazioni, costituisca il fulcro centrale di aggregazione tra i due "sottoassemblaggi" proteici destinati a formare il tegumento definitivo della particella virale. Oltre a ciò, VP16 potrebbe avere anche un ruolo nelle fasi di fusione dell'envelope primario con la membrana nucleare esterna necessarie al rilascio del virione nel citoplasma⁵⁸. Infatti, studi effettuati utilizzando un virus ricombinante esprimente VP16 come prodotto di fusione con la green fluorescent protein (GFP)⁴⁷ hanno evidenziato la sua presenza anche nei virioni che localizzano a livello dello spazio perinucleare facendone supporre l'acquisizione da parte del virus già a livello del nucleo 60 . Inoltre, mutanti privi di VP16, o codificanti una VP16 non funzionale, portano ad una drastica riduzione nella produzione di capsidi virali nel nucleo e quelli che comunque si formano e acquisiscono l'envelope primario non solo si accumulano nello spazio perinucleare, ma presentano anche evidenti anomalie morfologiche¹⁰³. Da un punto di vista funzionale VP16 presenta diversi ruoli, ma sicuramente il più noto è quello di transattivatore trascrizionale dei geni α che esplica veicolando fattori cellulari quali Oct-1, HCF e l'RNA polimerasi II a livello di specifiche sequenze

consenso presenti a monte delle regioni promotrici dei geni $IE^{1, 5, 78}$. E' stato dimostrato che l'attività trascrizionale di VP16 viene modulata da proteine facenti sempre parte del tegumento quali i prodotti genici di UL46 e UL47, ma il meccanismo alla base di tale regolazione non è stato ancora chiarito¹⁰⁷. Inoltre, nelle fasi terminali del ciclo replicativo, VP16 funge da regolatore dell'attività di VHS⁸⁸, un'endoribonucleasi che durante l'infezione virale promuove la degradazione degli RNA messaggeri cellulari e virali, inibendo così la sintesi proteica cellulare ed accelerando il *turnover* dei trascritti virali²⁷.

2.3.3 VP11/12, VP13/14 e VP22

All'interno del genoma di HSV-1 i geni UL46, UL47, UL48 e UL49, codificanti rispettivamente le proteine VP11/12, VP13/14, VP16 e VP22, costituiscono un *cluster* genico i cui membri interagiscono sia strutturalmente che funzionalmente durante il ciclo replicativo virale. Tutti i membri di questo complesso genico, codificando proteine strutturali, fanno parte dei geni γ e, conseguentemente, la sintesi delle proteine corrispondenti si verifica nelle fasi tardive dell'infezione in modo strettamente dipendente dalla sintesi del DNA virale. Tali proteine *in vitro* vanno incontro a fosfrilazione sia in cellule trasfettate che infettate, pur non presentando la medesima modifica post-traduzionale all'interno dei virioni purificati. In generale, un simile risultato potrebbe suggerire un ruolo della fosforilazione come segnale per la dissociazione delle proteine del tegumento dal nucleocapside nelle fasi iniziali dell'infezione⁵⁷.

La proteina VP11/12, così come tutte le proteine codificate dal *cluster* precedentemente descritto, è presente in un numero molto elevato di copie all'interno del tegumento ed è caratterizzata da un peso molecolare compreso tra gli 80 e i 90 kDa in base al differente livello di fosforilazione cui viene sottoposta ad opera di chinasi cellulari o virali. Pur potenziando l'efficienza con cui VP16 media l'espressione dei geni α , il gene UL46 non è essenziale per la replicazione virale *in vitro*. A livello strutturale, VP11/12 presenta una forte affinità per il capside nel virione, mentre nelle cellule infettate localizza prevalentemente a livello delle membrane del *trans*-Golgi *network*. Un simile comportamento troverebbe giustificazione supponendo che la proteina virale neo-sintetizzata venga diretta alle membrane cellulari, in particolar modo a quelle del *trans*-Golgi *network*, dove, durante l'acquisizione dell'*envelope* secondario, lo stretto contatto tra il nucleocapside e tale proteina porterebbe all'associazione identificata nel virione, in accordo col modello di assemblaggio e gemmazione a due fasi⁵⁹.

Il gene UL47 codifica due proteine note come VP13 e VP14, rispettivamente di 82 e 81 kDa di peso molecolare. Entrambe sono presenti in grandi quantità nel tegumento e subiscono svariate modifiche post-traduzionali tra cui fosforilazioni, glicosilazioni e nucleotidilazioni⁵². La proteina VP13/14 presenta un ruolo legato soprattutto alla modulazione dell'espressione genica virale, sia di tipo indiretto che diretto. Nel primo caso, è stato dimostrato che virus deleti di UL47 esprimono livelli ridotti di

proteine codificate dai geni IE e questo fenomeno è stato associato ad un ruolo di VP13/14 nella regolazione dell'attività trascrizionale di VP16. Nel secondo caso, invece, è stato dimostrato che, mediante un dominio N-terminale ricco in arginina, che funge anche da segnale di localizzazione intracellulare, VP13/14 favorisce l'espressione dei trascritti virali permettendone l'esportazione dal nucleo cellulare²⁴. VP22 è una proteina codificata dal gene UL49 che presenta un peso molecolare pari a 38 kDa. Nel citoplasma il legame di VP22 causa la riorganizzazione dei microtubuli e l'importo della proteina virale nel nucleo dove una successiva interazione con la cromatina mitotica ne favorisce la ritenzione in questo distretto cellulare⁵⁰. Inoltre, dati sperimentali hanno evidenziato un accumulo di questa proteina anche a livello delle vescicole del trans-Golgi network, dove verrebbe assemblata nel virione, tramite l'interazione con VP16 e fattori cellulari non ancora identificati^{8, 36}. VP22 non è essenziale per la replicazione virale *in vitro*, tuttavia mutanti deleti di UL49 non sono in grado d'incorporare nel virione le proteine a ICP0 e ICP4 oltre a presentare difetti nella propagazione sia in vitro che in vivo. Tali limiti sarebbero forse riconducibili ai ridotti livelli di gD e gE incorporate nel virione in seguito alla mancata interazione proprio con VP22 durante le fasi finali di assemblaggio della particella virale²⁵. Infine, VP22 potrebbe avere un ruolo nel favorire l'avvio dell'infezione tra cellule adiacenti in un processo definito diffusione intercellulare⁸⁵. Infatti, in un recente lavoro è stato dimostrato che VP22 può legare e veicolare tra cellule diverse un mRNA codificante una proteina di fusione fluorescente con un meccanismo recettore-indipendente e che tale mRNA viene effettivamente tradotto nelle cellule riceventi anche se restano ancora da delineare il meccanismo, l'efficienza e la selettività di tale trasferimento⁸⁵.

2.4 Il pathway dei multivesicular bodies

Il sistema endosomiale eucariotico è formato da una fitta rete di vescicole e organelli membranosi che coordina il trasporto di svariate proteine tra membrana plasmatica, *trans*-Golgi *network* (TGN) e lisosomi¹¹. Vi sono due vie principali con cui una proteina può entrare in questo *pathway*: le vescicole provenienti dal TGN (nel caso di proteine di nuova sintesi, ma assemblate in modo scorretto che devono essere eliminate, o di precursori degli enzimi idrolitici che devono essere trasportati ai

lisosomi) e le vescicole provenienti dalla membrana plasmatica (nel processo di regolazione del numero di recettori presenti sulla superficie cellulare)³⁰ (Fig. 5).



Figura 5. Il sistema endosomiale in cellule eucariotiche. Le proteine destinate alla degradazione nel lisosoma vengono secrete nelle vescicole intraluminali dei MVB che, a propria volta, sono destinate a fondersi con i lisosomi (immagine tratta da Babst, *Traffic*, 2005, 6: 2-9).

In generale, gli endosomi rappresentano un insieme piuttosto eterogeneo in cui è possibile distinguere tra endosomi precoci e tardivi sulla base del momento in cui il materiale endocitato viene introdotto nell'endosoma stesso. Durante la maturazione da precoci a tardivi, gli endosomi modificano composizione, morfologia e localizzazione. Gli endosomi precoci presentano grandi quantità di fosfatidilinositolo (3) fosfato [PI(3)P], hanno un'apparenza prevalentemente tubulare e localizzano alla periferia cellulare. Quelli tardivi, invece, sono caratterizzati dalla presenza di fosfatidilinositolo (3,5) bisfosfato [PI(3,5)P2], acido lisobisfosfatidico (LBPA) e glicoproteine specifiche definite LAMP-1 e LAMP-2 (lysosomal-associated membrane protein), sono sferici e si trovano in prossimità del nucleo^{35, 45, 104}. Un ruolo centrale in questo sistema di smistamento è rivestito dai multivesicular bodies (MVB), organelli membranosi derivanti dagli endosomi tardivi e arricchiti di diverse centinaia di vescicole interne originate dall'invaginazione e dalla gemmazione della membrana endosomiale esterna^{3, 105}. Nel lievito Saccharomyces cerevisiae, sistema eucariotico in cui inizialmente è stato studiato il processo di biogenesi dei MVB, sono state identificate almeno 17 proteine coinvolte nella formazione delle loro vescicole interne. Tali proteine vengono definite Vps (Vacuolar protein sorting) di classe E in quanto la mutazione di una qualunque di esse porta alla formazione del cosiddetto fenotipo di classe E in cui gli endosomi appaiono ingrossati e impilati a comporre un sistema di cisterne membranose appiattite non connesse tra loro⁴⁰ (Fig.

6). Sebbene gli studi iniziali siano stati eseguiti nel lievito per la maggiore semplicità di questo organismo modello, in realtà tutte le cellule eucariotiche presentano nel proprio genoma geni codificanti proteine ortologhe alle Vps di classe E caratterizzate da una netta conservazione delle loro funzioni specifiche⁶².



Figura 6. *Multivesicular bodies* e il fenotipo di classe E. A-C. Sezione tomografica (A) e ricostruzione tridimensionale (B e C) di *multivesicular bodies wild type*. D-F. Sezione tomografica (D) e ricostruzione tridimensionale (E e F) di *multivesicular bodies* con fenotipo di classe E (immagini tratte e modificate da Hurley, *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2006, 35: 277-98).

Le proteine Vps si associano a formare quattro complessi transitori e sequenziali denominati ESCRT (*Endosomal sorting complex required for transport*)-0, I, II e III che vengono reclutati agli endosomi mediante interazioni sia di natura proteica che lipidica¹⁰⁴.

Il complesso ESCRT-0 è costituito fondamentalmente da due proteine denominate Vps27 e Hse1, ciascuna presentante domini necessari all'interazione con la membrana endosomiale e con la proteina che dovrà essere introdotta nelle vescicole interne dei MVB. Affinché tale introduzione sia possibile è necessario che la futura proteina *cargo* sia opportunamente modificata mediante coniugazione con l'ubiquitina, una piccola proteina che funge da principale segnale di riconoscimento per le molecole bersaglio del *pathway* endocitico-lisosomale^{37, 69}. In particolar modo Vps27 da un lato riconosce e lega l'ubiquitina coniugata alla proteina *cargo*, dall'altro riconosce e lega il fosfatidilinositolo 3 fosfato presente sulla membrana endosomiale. Contemporaneamente Hse1 interagisce con Vps23/Tsg101 (*tumor susceptibility gene 101*), una componente del complesso ESCRT-I⁴⁰. Infine, sia

Vps27 che HseI reclutano a livello della membrana endosomiale foglietti di clatrina il cui compito sembrerebbe quello di limitare la distribuzione di Vps27 così da concentrare le proteine *cargo* ubiquitinate in microdomini specifici dove possano più facilmente interagire col complesso ESCRT-I¹⁰⁴.

ESCRT-I è un complesso eterotetramerico costituito dalle proteine Vps23/Tsg101, Vps28, Vps37 e Mvb12, ciascuna presente in singola copia⁴⁶. ESCRT-I lega l'ubiquitina mediante Vps23/Tsg101 e contemporaneamente si aggrega al complesso ESCRT successivo mediante interazione diretta di Vps28 con Vps36 e di Vps23/Tsg101 sia con Vps36 che con Vps22, dove Vps22 e Vps36 sono entrambe componenti del complesso ESCRT-II¹⁰⁴.

L'unica altra componente del complesso ESCRT-II, oltre alle già citate Vps22 e Vps36, è la proteina Vps25, la sola presente in duplice copia. Grazie a Vps36 il complesso ESCRT-II è in grado di legare direttamente il fosfatidilinositolo 3 fosfato e indirettamente l'ubiquitina.

Prese singolarmente le interazioni di ciascuno dei complessi appena descritti con l'ubiquitina o con i lipidi della membrana endosomiale risultano piuttosto deboli, tuttavia la fitta rete di associazioni reciproche tra i vari costituenti fa sì che, nell'insieme, si venga a creare una "piattaforma" proteica in grado di legarsi saldamente alla superficie endosomiale e di convergervi più molecole *cargo* ubiquitinate⁴⁰.

Il complesso ESCRT-III, infine, è composto di 6 diverse proteine: Vps2, Vps20, Vps24, Snf7, Did2 e Vps60. Si ritiene che la formazione di ESCRT-III abbia inizio a partire da un nucleo originario dato dall'associazione di Snf7 e Vps20. Ciascuna di tali proteine presenta numerosi *partner* d'interazione che consentono il legame di ESCRT-III con i complessi precedenti⁶⁸. Infatti, Vps20 entra in contatto con ESCRT-II mediante interazione con Vps25, mentre Snf7 si associa indirettamente ad ESCRT-I grazie al reclutamento della proteina Bro1/AIP1 (*ALG-2 interacting protein 1*) che, a propria volta, interagisce con Vps23/Tsg101⁹⁵. La formazione delle vescicole interne ai MVB si verifica a questo livello e si ritiene che la proteina Snf7 abbia un duplice ruolo in tale meccanismo. Da un lato è stato dimostrato che tale proteina, formando filamenti organizzati a spirale, è in grado di causare il riarrangiamento della membrana a formare strutture tubulari in allontanamento dal citolplasma⁴⁰. Dall'altro, Snf7, come già accennato, recluta la proteina Bro1/AIP1 che, interagendo con le endofiline, potrebbe avere un ruolo importante nel controllare la curvatura

della membrana endosomiale¹⁴. La proteina Snf7, infine, richiama anche la deubiquitinasi Doa4 (*degradation of alpha*) responsabile della dissociazione dell'ubiquitina dalla proteina *cargo* prima della sua introduzione nei MVB^{39} .

La dissociazione dei complessi ESCRT e, conseguentemente, il riciclo dell'intero meccanismo è quindi possibile grazie all'intervento della proteina Vps4, un'AAA-ATPasi (*ATPases associated with diverse cellular activities*), reclutata dalle proteine Vps2 e Did2 del complesso ESCRT-III^{61, 82, 96} (Fig. 7).



Figura 7. Rappresentazione schematica del modello classico di biogenesi dei *multivesicular bodies* (MVB) in cellule di lievito (immagine tratta da Nickerson *et al.*, *EMBO J*, 2007, 8(7): 644-50).

Quanto appena descritto è il modello classico di rappresentazione della biogenesi dei MVB basato su un reclutamento lineare e sequenziale dei quattro complessi coinvolti in cui la proteina *cargo* ubiquitinata viene trasmessa dall'uno all'altro fino alla sua introduzione nelle vescicole intraluminali dell'organello stesso. Recentemente è stato proposto un modello "concentrico" alternativo in cui i complessi ESCRT-I, II e III si assemblerebbero attorno al complesso ESCRT-0 che fungerebbe da nucleo di aggregazione. Domini specifici nei complessi ESCRT-0, I e II medierebbero il riconoscimento della proteina *cargo*, il legame ai lipidi e l'assemblaggio di un primo supercomplesso sulla membrana endosomiale sotto cui verrebbero concentrate le proteine *cargo*. Esternamente si assemblerebbero le subunità del complesso ESCRT-III che recluterebbero le proteine Bro1/AIP1, Doa4 e Vps4. La dissociazione delle vescicole rendendo così disponibili le proteine *cargo* alla deubiquitinazione. Infine,

nell'ordine, seguirebbero: l'invaginazione della membrana endosomiale, l'internalizzazione delle proteine *cargo*, la gemmazione della vescicola e la dissociazione delle subunità formanti il complesso ESCRT-III. La principale innovazione introdotta dal modello "concentrico", oltre alla cinetica di assemblaggio/disassemblaggio dei complessi ESCRT, è rappresentata dalla mancanza di rigida sequenzialità che nel modello classico contraddistingue tanto il reclutamento dei complessi che il trasferimento delle proteine *cargo* dall'uno all'altro⁶² (Fig. 8).



Figura 8. Rappresentazione schematica del modello "concentrico" di biogenesi dei *multivesicular bodies* (**MVB**) in cellule di lievito (immagine tratta da Nickerson *et al.*, *EMBO J*, 2007, 8(7): 644-50).

2.5 Il *pathway* dei *multivesicular bodies* e la gemmazione dei virus a RNA dotati di *envelope*

I virus dotati di *envelope* acquisiscono il proprio rivestimento gemmando attraverso membrane cellulari di differente origine, di conseguenza è indispensabile che tutti i componenti necessari alla formazione della particella infettiva localizzino nel sito in cui tale processo di gemmazione si verifica¹¹. Da un punto di vista topologico, il processo di gemmazione virale e quello di formazione delle vescicole interne ai MVB sono estremamente simili: in entrambi i casi una membrana si invagina allontanandosi dal citoplasma⁶⁷. In effetti, è stato dimostrato che svariati virus a RNA dotati di *envelope*, quali retrovirus, rabdovirus, filovirus, arenavirus e,

probabilmente, orto- e paramixovirus sfruttano il meccanismo alla base della biogenesi dei MVB e lo riprogrammano a proprio vantaggio⁵⁶. In particolar modo un virus può entrare nel *pathway* dei MVB a livello delle membrane endosomali, essere incorporato nelle loro vescicole e venire rilasciato seguendo la normale via esocitotica oppure può reindirizzare le proteine coinvolte in tale *pathway* a livello della membrana plasmatica e gemmare direttamente nell'ambiente extracellulare²¹. I virus che sfruttano questa via hanno sviluppato almeno due sistemi distinti e spesso complementari per accedere al complesso meccanismo che porta alla gemmazione delle vescicole interne ai MVB: la presenza di particolari sequenze note come *Late domain* (*L-domain*) nelle proteine strutturali virali e/o la loro ubiquitinazione⁵⁶.

2.5.1 Late domain virali

In generale un *L-domain* è una corta sequenza aminoacidica particolarmente ricca in prolina che funge da elemento di riconoscimento e attacco per svariate proteine appartenenti al *pathway* dei MVB. Per definizione, gli *L-domain* virali, del tutto identici a quelli cellulari, sono sequenze essenziali per un efficiente rilascio della progenie virale. La loro mutazione, infatti, induce un caratteristico difetto fenotipico che si verifica nelle fasi terminali dell'assemblaggio virale e che consiste nella mancata separazione tra l'*envelope* e la membrana cellulare al momento della gemmazione⁶⁵. Una medesima proteina molto spesso possiede più *L-domain* che possono agire in modo sinergico e che, in alcuni casi, possono continuare a svolgere il proprio compito anche se spostati in punti differenti all'interno della proteina di appartenenza⁵⁶. Sono state identificate almeno quattro classi principali di *L-domain*, ciascuna volta all'interazione con uno specifico *partner* cellulare, P(T/S)AP, YPxL, PPxY e FPIV, anche se non si esclude che vi possano essere sequenze leggermente diverse o del tutto non canoniche ancora da individuare.

Il primo dominio ad essere scoperto e caratterizzato è stato l'*L-domain* P(T/S)AP (Pro-Thr/Ser-Ala-Pro) presente nella proteina p6 Gag del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1)³². Lo stesso dominio è poi stato rinvenuto anche nelle proteine Gag del virus della leucemia umana delle cellule T di tipo 1 (HTLV-1) e del virus della scimmia di Mason-Pfeizer (MPMV), nella proteina VP40 del virus Ebola e nelle proteine Z di alcuni arenavirus⁵⁶. Il *partner* cellulare del motivo P(T/S)AP è costituito dalla proteina Tsg101, componente del complesso

ESCRT-I, che possiede un dominio UEV (*Ubiquitin E2 variant*) in grado di riconoscere e legare in modo specifico sia il motivo P(T/S)AP che l'ubiquitina. Vi sono numerose prove che sottolineano come la facilitazione nella gemmazione di virus quali HIV-1 grazie all'azione del dominio P(T/S)AP siano da attribuirsi alla sua interazione con Tsg101. Tra le principali vi sono il fatto che la deplezione di Tsg101 arresta la gemmazione virale e che qualunque mutazione a carico dell'*L-domain* che ne impedisce l'interazione con il proprio *partner* causa comunque l'inibizione del rilascio virale³⁰.

Tsg101 interagisce anche con Bro1/AIP, *partner* cellulare del dominio YPxL (Tyr-Pro-x-Leu) presente nella proteina p6 Gag di HIV-1 e nella proteina p9 Gag del virus dell'anemia infettiva equina (EIAV)⁵⁶. Inoltre, la proteina Bro1/AIP1 riconosce e lega anche il dominio LxxLF (Leu-x-x-Leu-Phe), correlato alla sequenza YPxL, presente nelle proteine p6 Gag di alcuni lentivirus⁶, nonché nelle proteine della matrice di rabdovirus e filovirus⁹⁵. Anche in questo caso vi sono delle prove a favore dell'importanza dell'interazione tra le proteine strutturali virali e Bro1/AIP1 durante le fasi di gemmazione. Infatti, i dominanti negativi di AIP1, così come la sostituzione di uno qualunque degli aminoacidi presenti nel motivo YPxL, causa la perdita totale dell'attività dell'*L-domain* considerato e l'inibizione della gemmazione virale⁹⁵.

Il terzo motivo, PPxY (Pro-Pro-x-Tyr), interagisce con i componenti della famiglia Nedd4 delle ubiquitino-ligasi $E3^{56}$ ed è l'unico a non legare una proteina coinvolta direttamente nel *pathway* dei MVB⁶. Il motivo PPxY è presente nelle proteine strutturali di diversi retrovirus, tra cui il virus del sarcoma di Rous (RSV), HTLV-1, MPMV e il virus della leucemia murina di Moloney (MMuLV), in quelle di rabdovirus, ad esempio nel virus della stomatite vescicolare (VSV), di filovirus, ad esempio nel virus Ebola, e di alcuni arenavirus^{6, 56}. In questo caso l'interazione si basa sul riconoscimento del motivo PPxY da parte del dominio WW presente nelle HECT (*E6AP COOH terminus*) ubiquitino-ligasi cui appartiene anche la famiglia delle Nedd4. Vari studi hanno evidenziato l'importanza dell'interazione tra proteine strutturali virali e ubiquitino-ligasi, ad esempio dimostrando che la sovraespressione dei domini WW blocca la gemmazione virale e che l'attività enzimatica di particolari ubiquitino-ligasi HECT e la loro associazione col *pathway* dei MVB non solo promuove la gemmazione virale dipendente dal dominio PPxY, ma è necessaria affinché il virus possa fuoriuscire dalla cellula infettata⁵¹. Negli ultimi anni, infine, è stata individuata una quarta sequenza presumibilmente identificabile come un *L-domain*, FPIV (Phe-Pro-Ile-Val), necessaria alla gemmazione dei paramixovirus il cui *partner* cellulare, però, non è ancora stato identificato⁸¹.

2.5.2 Ubiquitinazione

L'ubiquitina rappresenta il segnale di eccellenza per indicare una proteina come substrato del sistema endocitico-lisosomale e, più in generale, come substrato per la degradazione intracellulare. L'ubiquitinazione di una proteina coinvolge in successione tre diversi enzimi indicati rispettivamente come E1, E2 ed E3. L'enzima E1 ha il compito di attivare l'ubiquitina, l'E3 di legarla alla proteina substrato e l'E2 di trasferire l'ubiquitina attivata dal primo all'ultimo enzima coinvolto. Il destino della proteina varia a seconda del numero di ubiquitine legate al substrato e del particolare residuo di lisina implicato nel legame stesso. Più precisamente, la monoubiquitinazione o la formazione di corte catene basate sul residuo di lisina 63 (K63) dirige la proteina substrato ai MVB e di qui ai lisosomi, mentre la poliubiquitinazione basata sul residuo di lisina 48 (K48) indirizza la proteina substrato alla degradazione nei proteasomi⁴⁵. Inoltre, l'ubiquitinazione rappresenta un elemento estremamente importante nel riconoscimento e nell'interazione delle varie proteine costituenti il pathway dei MVB. Infatti, molte di tali proteine non solo presentano diversi domini in grado di riconoscere l'ubiquitina, ma sono esse stesse ubiquitinate¹⁰⁴.

Aspetto opposto e complementare a quanto appena descritto è la deubiquitinazione. Il processo che porta alla formazione delle vescicole nei MVB e all'introduzione delle proteine *cargo* al loro interno, infatti, prevede l'intervento di enzimi specificamente in grado di rimuovere l'ubiquitina dalla proteina substrato prima della sua incorporazione nella vescicola e, più in generale, l'intervento di tali enzimi potrebbe costituire una forma di regolazione dell'intero sistema basato sui complessi ESCRT¹⁰⁴.

Come già accennato, l'ubiquitinazione delle proteine strutturali virali rappresenta la seconda strategia sfruttata dai virus per interagire con i protagonisti della biogenesi dei MVB, anche se questo aspetto risulta piuttosto controverso. Diversi retrovirus, tra cui HIV-1, incorporano elevati livelli di ubiquitina non coniugata all'interno delle

particelle neo-formate e la proteina p6 di Gag, a propria volta, risulta essere monoubiquitinata, seppur a bassi livelli. Se, da un lato, la presenza dell'ubiquitina nonconiugata potrebbe essere spiegata come un fenomeno secondario legato semplicemente alla presenza cospicua di tale molecola nel pathway utilizzato dal virus per gemmare, dall'altro, la coniugazione dell'ubiquitina a Gag potrebbe non essere così casuale, soprattutto considerando la presenza di un dominio PPxY al suo interno. Ciononostante, il rilascio e la replicazione di HIV-1 non sono minimamente alterati da mutazioni a carico dei residui di lisina della proteina p6 che costituiscono il sito di attacco dell'ubiquitina. Sebbene il ruolo funzionale dell'ubiquitinazione di Gag, quindi, non sia chiaro è comunque rilevante il fatto che l'eliminazione del pool di ubiquitina libera presente nella cellula implichi l'arresto della gemmazione virale nelle sue fasi terminali, anche se questo fenomeno potrebbe essere conseguenza della mancata ubiquitinazione di fattori cellulari coinvolti nel pathway piuttosto che di proteine virali³⁰. Indipendentemente dal coinvolgimento diretto dell'ubiquitinazione nell'incorporazione finale delle proteine strutturali nel virione, è stato dimostrato che la presenza di motivi PPxY nelle medesime proteine favorisce la gemmazione virale mediante il reclutamento delle HECT ubiquitino-ligasi, in particolare delle proteine WWP1, WWP2 e AIP4⁹³. Ciascuna di tali proteine presenta tre domini caratteristici: un dominio WW responsabile del riconoscimento del substrato, un dominio di legame alla membrana responsabile della localizzazione dell'enzima ed infine un dominio HECT ubiquitino-ligasico responsabile dell'ubiquitinazione delle proteine bersaglio⁵¹. E' importante sottolineare quindi che la presenza del dominio PPxY potrebbe avere come scopo non l'ubiquitinazione della proteina virale di appartenenza, quanto piuttosto quello di richiamare nel sito di gemmazione le ubiquitino-ligasi che, a propria volta, potrebbero veicolare fattori cellulari bersaglio dell'ubiquitinazione ed essenziali nel processo di formazione delle vescicole⁹³. In quest'ottica, infine, potrebbe essere spiegata anche la frequente co-presenza dei domini P(T/S)AP e PPxY nella medesima proteina strutturale. Una volta reclutata, l'ubiquitino-ligasi potrebbe ubiquitinare una proteina cellulare o virale presente in loco o trascinare con sé una proteina precedentemente ubiquitinata fino al sito di gemmazione così da favorire l'interazione con Tsg101, a propria volta reclutato mediante il dominio P(T/S)AP, o viceversa³⁰.

In conclusione, la relazione tra ubiquitina, ubiquitino-ligasi e gemmazione virale risulta evidente, anche se i meccanismi che sottendono tale rapporto non sono ancora stati identificati.

3. SCOPO

Numerosi studi svolti negli ultimi anni hanno ormai reso noto che svariati virus a RNA dotati di *envelope*, tra cui retrovirus, rabdovirus, filovirus, arenavirus e, presumibilmente, orto- e paramixovirus sfruttano specifici organelli cellulari noti come *multivesicular bodies* (MVB) per l'acquisizione del proprio rivestimento lipidico e la gemmazione dalla cellula infettata⁵⁶. I MVB, elemento centrale del *pathway* endocitico-lisosomale cellulare, sono degli organelli membranosi caratterizzati dalla presenza di centinaia di vescicole interne, la cui biogenesi è topologicamente identica al processo di gemmazione virale^{69, 104}. Le strategie messe a punto dai virus a RNA dotati di *envelope* per poter utilizzare a proprio vantaggio il complesso sistema proteico responsabile della formazione di tali vescicole sono fondamentalmente due: la presenza di *Late domain* nelle loro proteine strutturali e/o la loro ubiquitinazione^{11, 56}.

Alcune recenti pubblicazioni suggeriscono che anche i virus a DNA dotati di *envelope* possano adottare una strategia analoga a quella dei virus a RNA nelle fasi finali del proprio ciclo replicativo^{10, 15, 19}. Il presente lavoro si propone di apportare ulteriori prove a favore di tale ipotesi, in particolar modo per quel che riguarda l'herpes simplex virus di tipo 1 (HSV-1), scelto come modello di riferimento di una delle principali famiglie di virus a DNA dotati di *envelope*: gli *Herpesviridae*.
4. MATERIALI E METODI

MATERIALI

4.1 Linee cellulari

<u>293T</u>: cellule embrionali di rene umano, a morfologia stellata, che esprimono costitutivamente l'antigene T del virus vacuolante della scimmia (SV40) garantendo un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici che contengono l'origine di replicazione di tale virus. Le cellule 293T sono state gentilmente fornite dal Dott. D. Baltimore (Rockfeller University, New York, USA) (ATTC Number CRL-11268).

<u>VERO</u>: cellule di rene di scimmia, ampiamente usate per studiare i meccanismi di replicazione e di infezione di molti virus, tra cui HSV-1 (ATCC Number CCL-81).

Le cellule sono state coltivate in terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), addizionato con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS, *fetal bovine serum*) (Gibco), inattivato a 56°C per 30 minuti, e con gli antibiotici penicillina (100 U/ml) (Sigma) e streptomicina (100 μ g/ml) (Sigma).

Tutte le colture cellulari sono state mantenute alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5% di anidride carbonica e sottoposte a periodici controlli di routine per escludere contaminazioni.

4.2 Ceppi virali

<u>HSV-1 Ceppo F</u>: interamente sequenziato (numero di riferimento NCBI: 10306) rappresenta uno dei ceppi di riferimento per HSV-1. Questo isolato è stato gentilmente fornito dal Prof. Roizman (University of Chicago, Illinois, USA).

<u>HSV-1 V41</u>: virus ricombinante contenente la sequenza genica di UL48 fusa *in frame* con quella della *green fluorescent protein* (GFP). Il virus risulta paragonabile al *wild type* per quel che riguarda infettività e capacità replicativa⁴⁷. Tale virus è stato gentilmente fornito dal Prof. O'Hare (Marie Curie Research Institute, UK).

4.3 Plasmidi

<u>pcDNA3.1+ (Invitrogen)</u>: vettore per l'espressione di sequenze geniche in cellule di mammifero. Tale plasmide contiene a monte del sito di policlonaggio il promotore/*enhancer* precocissimo del citomegalovirus umano (HCMV) e l'origine di SV40 che permette la replicazione episomale in linee cellulari infettate in modo latente da SV40 o che esprimono l'antigene T del medesimo virus. Inoltre, la presenza del gene per la resistenza alla neomicina, rende possibile la selezione di linee cellulari stabilmente trasfettate con tale costrutto.

pcDNA3.1/V5-His/TOPO (Invitrogen): plasmide derivante dal vettore pcDNA3.1+ (Invitrogen). La sequenza relativa al sito di policionaggio di questo plasmide è interrotta e presenta alle estremità 3' delle deossitimidine libere atte all'inserimento di un prodotto di PCR previa opportuna poliadenilazione di quest'ultimo.

<u>pKXSB</u>: plasmide contenente le sequenze geniche UL33, UL34, UL35, UL36 e UL37 (parziale) di HSV-1, ceppo KOS, introdotte a livello dei siti di restrizione XbaI e EcoRI del sito di policlonaggio del vettore pUC19. Questo plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. P. Desai (Johns Hopkins University, Maryland, USA).

<u>pBJ5</u>: plasmide di espressione eucariotico contenente il promotore ibrido SR α costituito dalla sequenza del promotore precoce di SV40 fusa con la regione R ed U5 derivata dalla LTR (*Long Terminal Repeat*) del virus della leucemia umana tipo 1 (*Human T-cell leukemia virus type 1*, HTLV-1)⁹⁸. Tale plasmide è stato gentilmente concesso dal Dott. Göttlinger (University of Massachuetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pBJ5Nedd4-1</u>: plasmide contente la sequenza genica codificante l'ubiquitino-ligasi Nedd4-1 fusa con l'epitopo Flag all'estremità N-terminale, posta sotto il controllo del promotore ibrido SR α^{94} . Tale plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. Göttlinger (University of Massachusetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pBJ5Nedd4-2</u>: plasmide contente la sequenza genica codificante l'ubiquitino-ligasi Nedd4-2 fusa con l'epitopo Flag all'estremità N-terminale, posta sotto il controllo del promotore ibrido SR α^{94} . Tale plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. Göttlinger (University of Massachusetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pBJ5WWP1</u>: plasmide contente la sequenza genica codificante l'ubiquitino-ligasi WWP1 fusa con l'epitopo Flag all'estremità N-terminale, posta sotto il controllo del promotore ibrido $SR\alpha^{94}$. Tale plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. Göttlinger (University of Massachusetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pBJ5WWP2</u>: plasmide contente la sequenza genica codificante l'ubiquitino-ligasi WWP2 fusa con l'epitopo Flag all'estremità N-terminale, posta sotto il controllo del promotore ibrido $SR\alpha^{94}$. Tale plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. Göttlinger (University of Massachusetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pBJ5AIP4</u>: plasmide contente la sequenza genica codificante l'ubiquitino-ligasi AIP4 fusa con l'epitopo Flag all'estremità N-terminale, posta sotto il controllo del promotore ibrido $SR\alpha^{94}$. Tale plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. Göttlinger (University of Massachusetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pBJ5Tsg101HA</u>: plasmide contente la sequenza genica codificante la proteina cellulare Tsg101 fusa con l'epitopo HA, posta sotto il controllo del promotore ibrido SR α^{94} . Questo plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. Göttlinger (University of Massachusetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pBJ5AIP1HA</u>: plasmide contente la sequenza genica codificante la proteina cellulare AIP1 fusa con l'epitopo HA, posta sotto il controllo del promotore ibrido SR α^{94} . Questo plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. Göttlinger (University of Massachusetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pBJ5HAUb</u>: plasmide contente la sequenza genica codificante la forma monomerica dell'ubiquitina fusa con l'epitopo di emoagglutinina HA, posta sotto il controllo del promotore ibrido SR α^{94} . Questo costrutto deriva da un vettore che esprime un precursore ottamerico dell'ubiquitina, contenente un epitopo HA all'estremità N-terminale di ogni unità. Tale plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. Göttlinger (University of Massachusetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pBJ5UbHA K48R</u>: costrutto derivante dal plasmide pBJ5HAUb e codificante una forma mutante dell'ubiquitina fusa all'epitopo HA in cui il residuo di lisina 48 è sostituito da un residuo di arginina. Tale plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. Göttlinger (University of Massachusetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pBJ5UbHA K63R</u>: costrutto derivante dal plasmide pBJ5HAUb e codificante una forma mutante dell'ubiquitina, fusa all'epitopo HA, in cui il residuo di lisina 63 è sostituito da un residuo di arginina. Tale plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. Göttlinger (University of Massachusetts Medical School, Massachusetts, USA).

<u>pTL1-HAUb wt</u>: plasmide derivante dal vettore pTL1⁴⁹ in cui è stata clonata la sequenza codificante la proteina ubiquitina fusa all'epitopo HA⁴³. Questo plasmide è stato gentilmente fornito dalla Prof.ssa Campadelli-Fiume (Università di Bologna).

<u>pTL1-HAUb K0</u>: plasmide derivante dal vettore pTL1-HAUb wt e codificante una forma della proteina ubiquitina in cui tutti i residui di lisina sono mutati in arginina⁴⁹. Questo plasmide è stato gentilmente fornito dalla Prof.ssa Campadelli-Fiume (Università di Bologna).

<u>pEP36</u>: vettore contenente la sequenza del gene codificante la proteina del tegumento di HSV-1 UL36. Questo plasmide è stato gentilmente fornito dalla Prof.ssa Campadelli-Fiume (Università di Bologna).

<u>pBluescript II KS (+/-) phagemid (Stratagene)</u>: plasmide presentante un'origine di replicazione per fagi f1 (+) e contente il promotore per l'RNA polimerasi del fago T3 e del fago T7, posti rispettivamente in 5' e in 3' rispetto al sito di policlonaggio.

Il mantenimento e la selezione dei plasmidi precedentemente descritti in cellule procariotiche è stato possibile grazie alla presenza in ciascun costrutto dell'origine di replicazione batterica ColE1 o pUC di *Escherichia coli* e del gene codificante la resistenza all'antibiotico ampicillina (100 µg/ml). Per l'amplificazione dei diversi plasmidi in cellule procariotiche sono stati utilizzati i ceppi di *Escherichia coli* DH5a [*end*A1 *hsd*R17 ($r_{K}m_{K}^{+}$) *gln*V44*thi*-1 *rec*A1 *gyr*A (Nal^r) *rel*A1 Δ (*lacl*ZYA*arg*F)U169 *deo*R (Φ 80*dlac*\Delta(*lac*Z)M15)] o TOP10 [F⁻ *mcr*A Δ (*mrr-hsd*RMS- mcrBC) Φ 80*lac*Z Δ M15 Δ *lac*X74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG] (Invitrogen).

I ceppi batterici indicati sono stati coltivati in forma liquida in terreno Luria-Bertani [L.B.: Bacto-triptone 1% (p/v), estratto di lievito 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v)] in agitazione a 37°C o a 30°C a seconda del plasmide considerato. Quando necessario, il terreno è stato solidificato mediante aggiunta di agar 1.5% (p/v) e reso selettivo mediante l'aggiunta dell'opportuno antibiotico.

4.4 Oligonucleotidi innesco

Nelle reazioni a catena della polimerasi (PCR) sono stati utilizzati oligonucleotidi innesco opportunamente disegnati e riportati in tabella 1.

Primer	Sequenza nucleotidica (5'-3')	Temperatura di
		appaiamento
VP16HAF	5' A TAC GCG GCC GCC ATG TAC CCA TAC GAC GTC CCA GAT TAC GCT GAC CTC TTG GTC GAC GAG CTG 3'	58°C
VP16FlagF	5' A TAC GCG GCC GCC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GAC CTC TTG GTC GAC GAG CTG 3'	58°C
VP16R	5' CAT TAT GAA TTC CTA CCC ACC GTA CTC GTC AAT 3'	54°C
UL36F1-1599	5' GAT AAT GAA TTC GCC ACC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GGT GGC GGA AAC AAC ACT 3'	58°C
UL36R ₁₋₁₅₉₉	5' GCG CTA GAA CAG CTG GGC GAG GTC 3'	56°C
UL36F ₁₋₂₃₀₁	5' GAT AAT GAA TTC GCC ACC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GGT GGC GGA AAC AAC ACT 3'	58°C
UL36R ₁₋₂₃₀₁	5' GCG CTA GAC CCC GCG AGC GAG GGC 3'	56°C
UL36F ₉₅₂₉₋₁₀₁₃₉	5' TTA ACG CTC TAG ACG CGC GCT ACG TCT CGC G 3'	68°C
UL36R ₉₅₂₉₋₁₀₁₃₉	5' CGA TCG AAA ACG CGT GTC TGG CGG CA 3'	64°C
UL36MUT1F	5' CGA TCC CAC CAC CGC CTG CCT CCG CCC CCA AGA CC 3'	90°C
UL36MUT1R	5' GGT CTT GGG GGC GGA GGC AGG CGG TGG TGG GAT CG 3'	90°C
UL36MUT2F	5' CCA CCA CCG CCT GCC GCC GCC CCC AAG ACC 3'	89°C

UL36MUT2R	5' GGT CTT GGG GGC GGC GGC AGG CGG TGG TGG 3'	89°C
UL36MUT3F	5' GCG CCT TAC GGT CGC CGG CCG CGG CCT CTC CGG GGC TG 3'	86°C
UL36MUT3R	5' CA GCC CCG GAG AGG CCG CGG CCG GCG ACC GTA AGG CGC 3'	86°C
UL36MUT10F	5' ATC CCA CCA CCG CCT GCC TCC GCC GCC AAG ACC CCC GCC GCA 3'	92°C
UL36MUT10R	5' TGC GGC GGG GGT CTT GGC GGC GGA GGC AGG CGG TGG TGG GAT 3'	92°C
FKpnI	5' CCT TAA GAA GCT TGG TTC CGA GCT CGG ATC CAC 3'	80°C
RKpnI	5' GTG GAT CCG AGC TCG GAA CCA AGC TTC TTA AGG 3'	80°C
UL47F	5' AAT GAT GAA TTC GCC ACC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG TCG GCT CGC GAA CCC GCG GG 3'	64°C
UL47R	5' AAT GAT CTC GAG TTA TGG GCG TGG CGG GCC TCC C 3'	64°C
UL49F	5' AAT GAT GAA TTC GCC ACC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG ACC TCT CGC CGC TCC GTG AAG 3'	
UL49R	5' AAT GAT GCG GCC GCT CAC TCG ACG GGC CGT CTG G 3'	60°C

Tabella	1.	Oligonucleotidi	utilizzati	e	loro	principali	caratteristiche.
				-		P P	

METODI

4.5 Tecniche di biologia molecolare

4.5.1 Preparazione del DNA plasmidico

Il DNA plasmidico in grande scala ("Maxi prep") è stato estratto dal ceppo DH5 α di *E. coli* con il metodo della lisi alcalina e purificato con *QIAGEN Plasmid Kit*, un sistema QIAGEN[®] basato sull'utilizzo di colonne a scambio anionico. Con questo procedimento il DNA plasmidico si lega alla resina della colonna e viene purificato da RNA, proteine ed impurità ad alto peso molecolare mediante eluizione con tamponi a bassa concentrazione salina. Il DNA plasmidico viene successivamente eluito dalla colonna per mezzo di tamponi a maggiore concentrazione salina. Il plasmide, una volta eluito, viene concentrato e pulito dai sali mediante precipitazione con isopropanolo e lavaggio con etanolo al 70% (v/v). Con questa tecnica si ottengono preparazioni plasmidiche ad elevato grado di purezza adatte agli esperimenti di trasfezione delle cellule eucariotiche.

Nel caso di preparazioni plasmidiche in piccola scala ("Mini prep"), invece, è stato utilizzato il protocollo della lisi alcalina modificato per piccoli volumi di coltura batterica $(3 \text{ ml})^{80}$. Il DNA ottenuto in seguito a precipitazione con etanolo al 95% è stato risospeso in buffer TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8), contenente RNAsi pancreatica (20 µg/ml, Roche).

Il DNA ottenuto è stato quindi sottoposto a controllo mediante restrizione enzimatica (paragrafo 4.5.2) e successiva migrazione elettroforetica in gel d'agarosio in tampone salino TBE 1X (Tris-borato 9 mM, EDTA 1 mM). Inoltre la quantità di acido nucleico ottenuto è stato quantificato mediante lettura allo spettrofotometro (Eppendorf, Biophotometer), alla lunghezza d'onda di 260 nm, corrispondente al massimo di assorbimento, utilizzando cuvette di quarzo aventi un cammino ottico di 0,1 cm. La concentrazione del DNA è stata calcolata tramite la legge di Lambert-Beer (A = ε x l x C, dove A = densità ottica; ε = coefficiente di estinzione molare, che per il DNA a doppio filamento a 260 nm corrisponde a 6600 M⁻¹ cm⁻¹; l = cammino ottico; C = concentrazione della soluzione). La presenza di eventuali contaminazioni proteiche è stata rilevata tramite lettura della preparazione alla

lunghezza d'onda di 280 nm, corrispondente al picco di assorbimento del legame peptidico. Sono state considerate "pure" le preparazioni per le quali il rapporto $D.O_{.260}/D.O_{.280}$ era compreso tra 1,8 e 2.

4.5.2 Restrizioni enzimatiche

Le reazioni di restrizione enzimatica del DNA sono state effettuate utilizzando gli opportuni enzimi (Biolabs) nei rispettivi tamponi di reazione. Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dell'enzima (in genere 37°C) per il tempo richiesto, a seconda del tipo di endonuclesi impiegata e della quantità di acido nucleico da digerire. Anche le unità di enzima impiegate sono state proporzionali alla quantità di DNA da digerire.

Al termine della digestione, i campioni sono stati analizzati tramite migrazione elettroforetica in gel d'agarosio. Inoltre, per verificare la corretta dimensione dei frammenti sono stati impiegati opportuni marcatori di peso molecolare noto, tra cui il Marker VII (0.25 μ g/ml) e il Marker II (0.25 μ g/ml) (Roche/Boehringer).

4.5.3 Tecniche di clonaggio

In questo lavoro sono state utilizzate le seguenti strategie di clonaggio:

La sequenza genica da clonare è stata amplificata mediante la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR, paragrafo 4.5.5). A tale scopo sono stati disegnati opportuni oligonucleotidi innesco in grado di amplificare l'intera sequenza di interesse addizionata all'estremità 5' di sequenze corrispondenti ad epitopi noti (Flag o HA) e di sequenze di taglio riconosciute specificamente da opportuni enzimi di restrizione sia all'estremità 5' che 3' (Tabella 1). Alla fine della reazione di PCR la miscela risultante è stata caricata in gel d'agarosio insieme ad opportuni marcatori di peso molecolare noto per verificare la corretta dimensione degli amplificati. La porzione di gel contenente la banda corretta è stata tagliata mediante l'utilizzo di un bisturi ed il DNA è stato eluito grazie all'utilizzo del kit

QIAGEN[®] QIAquick gel extraction kit. Questo sistema è basato sulla solubilizzazione dell'agarosio e sul successivo legame specifico degli acidi nucleici, in presenza di un tampone ad alta concentrazione salina, alla membrana di silice-gel di una colonna a scambio anionico. Le impurità, quali sali, agarosio, etidio bromuro, non sono trattenute dalla membrana di silice ed il DNA così purificato viene eluito con un tampone ad alta forza ionica. Successivamente sia il frammento purificato che il vettore in cui tale frammento doveva essere inserito sono stati sottoposti a taglio enzimatico con gli opportuni enzimi di restrizione. I prodotti delle digestioni quindi sono stati separati in gel d'agarosio, purificati ed infine ligati tra loro. A tale scopo sono state sfruttate le proprietà enzimatiche della DNA ligasi del batteriofago T4 ($4x10^5$ U/ml) (Biolabs), capace di catalizzare *in vitro* la formazione di legami fosfodiesterici tra il residuo di fosfato in 5' ed il gruppo idrossilico in 3' delle estremità adiacenti. Le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 10 µl impiegando 0.5 unità di ligasi e incubate per 16 ore a 16°C. Le quantità dei due frammenti usate nella reazione di ligazione sono state calcolate utilizzando la seguente formula:

$$X(ng)=Y (pb) \ge 50/V (pb)$$

Dove: X = ng dell'inserto Y (pb) = dimensioni in paia di basi dell'inserto 50 = 50 ng di vettore V (pb) = dimensioni in paia di basi del vettore plasmidico

I prodotti della ligazione sono stati utilizzati per la trasformazione dei batteri DH5α come descritto nel paragrafo 4.5.4.

Le colonie resistenti all'ampicillina in seguito sono state incubate in 5 ml di terreno LB, in presenza dell'antibiotico, e fatte crescere 12 ore a 37°C. La correttezza del DNA plasmidico è stata verificata successivamente mediante restrizione enzimatica o sequenziamento in seguito all'estrazione del DNA secondo il protocollo delle "Mini prep" (si veda paragrafo 4.5.1).

- La seconda strategia di clonaggio si è basata sull'utilizzo del pcDNA3.1/V5-His/TOPO TA cloning kit dell'Invitrogen. In questo caso il frammento d'interesse, ottenuto mediante PCR e opportunamente verificato, è stato sottoposto a poliadenilazione allo scopo di aggiungere delle sequenze di poliadenina alle sue estremità. La reazione di poliadenilazione è stata eseguita sfruttando la proprietà della polimerasi *AmpliTaq*[®] *Gold* (Applied Biosystem) di aggiungere spontaneamente delle code di poliadenina alle estremità dei prodotti di amplificazione. Tale reazione quindi è stata eseguita preparando una miscela contenente il frammento di PCR purificato, un tampone contenente MgCl₂ 1.5 mM, dATP 0.2 mM e una quantità di enzima pari a 1U, preventivamente attivato (95°C per 10 minuti). La miscela così ottenuta è stata incubata a 70°C per 30 minuti. Il frammento poliadenilato quindi è stato introdotto nel vettore pcDNA3.1/V5-His/TOPO incubando per 30 minuti a temperatura ambiente una miscela contenente 400-500 ng dell'inserto, 10 ng di vettore e un'opportuna soluzione salina (NaCl 1.2M e MgCl₂ 0.06M). Il costrutto così ottenuto è stato utilizzato per trasformare dei batteri TOP10 come riportato nel paragrafo 4.5.4. L'amplificazione e il controllo del plasmide desiderato è stato infine valutato in modo analogo a quanto descritto precedentemente.
- L'ultima strategia di clonaggio si è basata sull'ottenimento del frammento di DNA da clonare mediante restrizione enzimatica eseguita su un plasmide contenente la sequenza genica di interesse. Il frammento è stato purificato da gel d'agarosio e ligato con l'opportuno plasmide, a propria volta sottoposto ad opportuna restrizione con i medesimi enzimi e purificato. Dopo la ligazione, i costrutti contenenti il frammento d'interesse sono stati identificati seguendo lo stesso procedimento descritto per la prima strategia di clonaggio.

4.5.4 Competenza e trasformazione batterica

I plasmidi ed i prodotti delle reazioni di ligazione sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule di *E.coli*, ceppo DH5 α o TOP10 rese artificialmente competenti mediante la tecnica del cloruro di calcio.

Le colonie batteriche sono state fatte crescere a 37°C in 3 ml di terreno liquido LB contenente MgCl₂ 15 mM, in assenza di antibiotici per circa 12 ore, fino a raggiungere una densità ottica compresa tra 0.4 e 0.6 alla lunghezza d'onda di 600 nm. In seguito, l'inoculo è stato trasferito in 500 ml dello stesso terreno. Una volta raggiunta la densità ottica desiderata, la coltura è stata raffreddata rapidamente in ghiaccio per interrompere la crescita batterica; i batteri sono stati quindi sedimentati per centrifugazione a 3500 rpm a 4°C per 15 minuti e risospesi in una soluzione fredda contenente MnCl₂-4H₂O 10 mM, CaCl₂ 50 mM, MES [2-(*N-morpholino)ethanesulfonic acid*] 10 mM pH 6.3. I batteri sono stati poi centrifugati, delicatamente risospesi in 12,5 ml della stessa soluzione fredda addizionata di glicerolo al 15% (v/v) e quindi aliquotati e conservati a -80°C.

La trasformazione batterica è stata effettuata addizionando a 50 μ l di cellule batteriche competenti il DNA plasmidico (100-300 ng), o i prodotti delle reazioni di ligazione. Dopo aver lasciato incubare la miscela in ghiaccio per 30 minuti, la stessa è stata sottoposta a shock termico mediante esposizione a 37°C per 2 minuti ed immediata reintroduzione in ghiaccio. I batteri quindi sono stati incubati a 30°C o a 37°C per un'ora in 200 μ l di LB, consentendo così l'espressione e la sintesi della proteina che conferisce la resistenza all'antibiotico di selezione.

In seguito, tutta la sospensione è stata seminata in piastre Petri contenenti LB-Agar addizionato con ampicillina 100 μ g/ml ed incubata 12 ore a 30°C o a 37°C al fine di selezionare i batteri trasformati.

4.5.5 Reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR)

Per l'amplificazione dei frammenti di DNA di interesse è stata utilizzata la tecnica di amplificazione a catena della polimerasi (PCR). Generalmente sono state preparate delle miscele contenenti 5 μ l di tampone 10x (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15mM), 8 μ l di dNTP 625 M, 1 μ l di oligonucleotide senso 10 μ M, 1 μ l di oligonucleotide non senso 10 μ M, 0.2 μ l di *AmpliTaq*[®] Gold 5 U/ μ l, 100 ng di DNA ed acqua deionizzata fino ad un volume di 50 μ l. La reazione di amplificazione è stata effettuata in termociclatore (Mastercycler personal, Eppendorf) mediante la ripetizione di 30 cicli successivi comprendenti una fase di denaturazione a 94°C, una di appaiamento degli oligonucleotidi alla temperatura richiesta ed una di elongazione

a 72°C. Allo scopo di denaturare il DNA e di attivare la polimerasi, si è fatto precedere ai 30 cicli di PCR una incubazione della miscela di reazione a 94°C per 5 minuti. Tutti i reagenti utilizzati sono Applied Biosystem.

Nel caso di amplificazioni relative ai prodotti genici di HSV-1, invece, a causa dell'elevato contenuto in G-C che li contraddistingue, è stato necessario ricorrere al kit Bio-rad *iProof*TM *High-Fidelity DNA Polymerase*. In questo caso la miscela di reazione, caratterizzata da un volume analogo a quello descritto precedentemente, comprendeva: 10 µl di tampone 5X specifico per sequenze ricche in G-C, 4 µl di dimetilsolfossido 3%, 0.5 µl di ciascun oligonucleotide innesco 10 µM, 1.5 µl di dimetilsolfossido 3%, 0.5 µl di polimerasi 2 U/µl, 200 ng di DNA e acqua deionizzata. La reazione di amplificazione è stata effettuata in termociclatore (Mastercycler personal, Eppendorf) mediante la ripetizione di 35 cicli successivi comprendenti una fase di denaturazione a 98°C, una di appaiamento degli oligonucleotidi alla temperatura richiesta ed una di elongazione a 72°C. Allo scopo di denaturare il DNA e di attivare la polimerasi, si è fatto precedere ai 35 cicli di PCR una incubazione della miscela di reazione a 98°C per 1 minuto. I frammenti ottenuti sono stati caricati in gel d'agarosio utilizzando gli opportuni marcatori di peso molecolare per verificarne le corrette dimensioni.

4.5.6 Mutagenesi sito-specifica

Per introdurre le mutazioni sito-specifiche all'interno delle sequenze d'interesse è stata utilizzata la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando opportuni oligonucleotidi innesco tali da appaiare perfettamente con la sequenza originaria tranne che per uno o più nucleotidi. La miscela di reazione comprendeva: 5 µl di tampone 10X specifico per l'enzima utilizzato (200 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM MgSO₄, 100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Triton[®] X-100, 1 mg/ml *nuclease-free* BSA), 1.25 µl di ciascun oligonucleotide innesco 10 µM, 5 µl di dNTP 2.5 M, 1 µl di polimerasi *PFU UltraTM High-Fidelity DNA* (2.5 U/µl) (Stratagene), 50 ng di DNA e acqua deionizzata fino ad un volume finale di 50 µl. La reazione di amplificazione è stata effettuata in termociclatore (Mastercycler personal, Eppendorf) mediante la ripetizione di 12 o 16 cicli successivi (per la sostituzione rispettivamente di uno o più nucleotidi) comprendenti una fase di denaturazione a 95°C, una di appaiamento degli oligonucleotidi a 55°C ed una di elongazione a 68°C

al termine della quale lo stesso ciclo è stato ripetuto un'ultima volta. Allo scopo di denaturare il DNA e di attivare la polimerasi, si è fatto precedere ai cicli di PCR una incubazione della miscela di reazione a 95°C per 1 minuto. Immediatamente in seguito alla reazione di PCR la miscela è stata sottoposta a digestione enzimatica con 1 μ l dell'enzima DpnI (Biolabs) per un'ora a 37°C. L'enzima, riconoscendo e digerendo specificamente solo il DNA metilato ed emimetilato, viene utilizzato per eliminare il DNA parentale da quello mutagenizzato. Infine 5 μ l del digerito sono stati utilizzati per trasformare i batteri DH5 α . Una volta amplificato ed estratto, la mutazione presente nel DNA è stata verificata mediante sequenziamento (paragrafo 4.5.7).

4.5.7 Sequenziamento di plasmidi

Oltre all'analisi mediante restrizione enzimatica, i costrutti ottenuti in questo lavoro di tesi sono stati controllati tramite sequenziamento. La reazione di sequenziamento è stata allestita impiegando il kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready *Reaction* (Applied Biosystem), basato sul metodo di Sanger modificato⁸⁹. Tale kit contiene i 4 dideossinucleotidi trifosfato (ddNTP) coniugati specificamente con un cromoforo, i deossinucleosidi-trifosfati, l'enzima AmpliTag[®] Gold e il tampone di reazione. La reazione è stata portata a termine in un volume finale di 10 µl in presenza di 3.2 pmol di primer innesco, 1 µl della miscela del kit, 1 µl di tampone specifico 5X (Tris-HCl 200 mM, pH 9.0, MgCl₂ 5 mM) e 200 ng di DNA plasmidico. La reazione di sequenziamento è stata condotta in un termociclatore (Mastercycler personal, Eppendorf) mediante 30 cicli di amplificazione, dove ogni ciclo è composto dalle seguenti temperature: 95°C per 30 secondi, 50°C per 10 secondi, 60°C per 4 minuti. Il prodotto della reazione è stato precipitato in presenza di 1/10 del volume di sodio acetato 3M pH 4.6 e 2 volumi di etanolo e risospeso in acqua per essere caricato nel sequenziatore automatico (ABI PRISMA 3100, Applied Biosystem). Tale strumento utilizza il metodo di separazione su gel capillare ed i frammenti di DNA vengono analizzati da un rivelatore, che converte la diversa fluorescenza emessa dai cromofori eccitati (corrispondente ai diversi ddNTP

terminatori) in un picco di colore diverso. Il risultato di un sequenziamento automatico, quindi, corrisponde ad un profilo densitometrico di picchi fluorescenti.

4.6 Tecniche di biologia cellulare

4.6.1 Tecniche di trasfezione

Il trasferimento *in transient* di DNA esogeno in cellule 293T è stato realizzato utilizzando complessi liposomici di lipidi cationici (LipofectamineTM 2000, Invitrogen).

Il giorno precedente la trasfezione, sono state seminate $1,5x10^6$ cellule 293T in una fiasca con superficie di 25 cm² (T25) (Falcon) in DMEM con 10% (v/v) di FBS, senza antibiotici in un volume finale pari a 5 ml. Trascorse 24 ore, quando le cellule sono risultate ad una confluenza del 60-80%, si è proceduto alla trasfezione *in vitro* allestendo due miscele di reazione così costituite:

miscela 1: 500 l di DMEM senza siero e 20 µl di soluzione di liposomi

<u>miscela 2</u>: 500 l di DMEM senza siero ed il DNA da trasfettare. La quantità totale di DNA da utilizzare è 8 μ g; nel caso in cui il DNA specifico impiegato nell'esperimento fosse in quantità inferiore, è stato addizionato il plasmide pBluescript[®] II KS (+/-) phagemid fino a raggiungere la quantità di acido nucleico ottimale.

La miscela 1 è stata addizionata alla miscela 2 e incubata per 20 minuti a temperatura ambiente; nel frattempo è stato sostituito il terreno al monostrato di cellule con 4 ml di DMEM addizionato di FBS al 10% (v/v). Successivamente, la miscela unica è stata aggiunta al monostrato di 293T e le cellule sono state incubate a 37°C per un opportuno intervallo di tempo (24-48 ore).

Nel caso in cui la trasfezione sia stata eseguita in fiasche con superficie pari a 75 cm² (T75) (Falcon), il giorno precedente sono state seminate $3x10^6$ cellule 293T, in DMEM con 10% (v/v) di FBS, senza antibiotici in un volume finale di 10 ml. Trascorse 24 ore, si è proceduto come precedentemente descritto allestendo due miscele di reazione così costituite:

miscela 1: 1.5 ml di DMEM senza siero e 50 µl di soluzione di liposomi

<u>miscela 2</u>: 1.5 ml di DMEM senza siero ed il DNA da trasfettare. La quantità totale di DNA da utilizzare è 20-24 μ g eventualmente raggiunti addizionando il plasmide

pBluescript[®] II KS (+/-) phagemid fino a raggiungere la quantità di acido nucleico ottimale.

4.6.2 Preparazione e titolazione di stock virali di HSV-1

Gli stock virali sono stati preparati mediante amplificazione del virus su monostrato di cellule VERO. Le cellule sono state lavate con PBS 1X (NaCl 8.18 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.78 g, KH₂PO₄ 0.24 g e acqua deionizzata per raggiungere il volume di 1 litro) ed infettate lasciando adsorbire il virus per 60 minuti a 37°C in atmosfera umidificata e al 5% di anidride carbonica. Quindi, il monostrato di cellule è stato lavato nuovamente in PBS 1X ed è stato aggiunto DMEM al 2% (v/v) di FBS. Le cellule infettate infine sono state raccolte e sottoposte a vari cicli di gelo-scongelo e sonicatura. Dopo aver centrifugato l'omogenato così ottenuto a 13000 rpm per 5 minuti, il sovranatante è stato aliquotato e congelato a -80°C, dopo l'aggiunta di FBS al 50% (v/v) finale.

I ceppi ottenuti sono stati titolati sulle stesse linee cellulari utilizzate per la loro produzione. Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla densità di 10^5 cellule/ml e lasciate aderire a 37°C per 24 ore. Successivamente le cellule sono state lavate con PBS 1X ed infettate con 200 µl di DMEM senza siero, contenente concentrazioni scalari (in base 10) di virus. Si è lasciato adsorbire il virus per 60 minuti a 37°C, quindi si è lavato nuovamente il monostrato in PBS 1X e si è aggiunto DMEM al 2% (v/v) di FBS, addizionato con il 2% di carbossimetilcellulosa (Sigma). Dopo un'incubazione di 48 ore a 37°C, sono state contate le placche formatesi sul monostrato per effetto citopatico del virus. Il titolo virale è stato espresso come PFU/ml.

4.6.3 Infezione di colture cellulari con HSV-1

Il procedimento di infezione di cellule in monostrato (293T) da parte dei ceppi virali descritti è stato del tutto analogo a quanto descritto nel paragrafo precedente. L'infezione generalmente è stata monitorata mediante osservazione al microscopio ottico. Quando circa l'80-90% delle cellule mostrava i caratteristici effetti citopatici dell'infezione, quali la formazione delle placche di lisi, sono state raccolte per le

successive procedure di lisi (paragrafo 4.6.4) o fissate per verificare la localizzazione di determinate proteine mediante immunofluorescenza indiretta (paragrafo 4.6.8).

4.6.4 Immunoprecipitazione (IP)

La tecnica dell'immunoprecipitazione è stata utilizzata per purificare da lisati di cellule trasfettate *in transient* la proteina oggetto d'analisi, arricchendone la concentrazione. Tale tecnica sfrutta il riconoscimento specifico tra un anticorpo, coniugato ad una matrice solida di sefarosio (*Protein G SepharoseTM 4 Fast Flow*, GE Healthcares), e il corrispondente epitopo antigenico fuso alla proteina da immunoprecipitare.

A 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state lavate in PBS 1X e lisate in uno dei seguenti tamponi di lisi addizionati di una miscela di inibitori delle proteasi (Roche): RIPA 1X [PBS 1X, NP40 (Sigma) 1% (v/v), Sodio Deossicolato 0.5% (v/v) (Sigma), SDS 0.05 % (v/v) (Bio-Rad)] o EBC [Tris 50 mM pH 8.00, NaCl 170 mM, NP40 (Sigma) 0.5%].

Per favorire la lisi le cellule sono state incubate in ghiaccio per 30 minuti e successivamente centrifugate a 13000 rpm per 20 minuti così da poter separare i lisati dalle carcasse cellulari.

Nel frattempo, al fine di garantire la formazione del complesso biglia-anticorpo, 50 μ l di biglie per campione di cellule trasfettate sono state lavate col tampone di lisi e incubate a temperatura ambiente per tre ore in agitazione con 0.4 μ g/ml dell'anticorpo specifico per l'epitopo fuso alla proteina di interesse.

Successivamente, i complessi biglia-anticorpo sono stati nuovamente lavati nel tampone di lisi per eliminare l'anticorpo in eccesso e, quindi, incubati in agitazione con i lisati cellulari per 2 ore a 4°C. Generalmente 30 µl di lisati cellulari venivano conservati per verificare l'espressione della proteina d'interesse.

Al termine di questa seconda incubazione i complessi definitivi biglia-anticorpoproteina sono stati ulteriormente lavati col tampone di lisi e risospesi in 50 µl del tampone di caricamento *Loading Buffer* (LB) 2X (6.25 ml di Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 10.03 ml di acqua distillata, 2.25 ml di glicerolo, 5 ml di SDS 10%, 0.25 ml di blu di bromofenolo 1% e 1.22 ml di β -mercaptoetanolo). I campioni così ottenuti sono stati bolliti per qualche minuto per separare i complessi formatisi, sottoposti a SDS-gel elettroforesi (paragrafo 4.6.6) ed analizzati mediante Immunoblot (paragrafo 4.6.7).

4.6.5 Co-immunoprecipitazione (Co-IP)

Questa tecnica si basa sull'evidenza che la maggior parte delle interazioni proteiche che avvengono *in vivo* sono mantenute quando la cellula è sottoposta a lisi in condizioni non denaturanti. Quindi se due proteine interagiscono *in vivo*, immunoprecipitandone una con un anticorpo specifico *in vitro*, si dovrebbe ottenere anche la precipitazione dell'altra.

La procedura seguita ricalca quella delle immunoprecipitazioni, ma con alcune importanti modifiche. Infatti, generalmente è stato usato un tampone lisi (addizionato di inibitori delle proteasi) non denaturante e contenente un detergente non ionico come l'NP40, in modo da preservare le interazioni tra le proteine del lisato [NP40 1X: NP40 (Sigma) 2.5%, Tris-HCl 100 mM pH 7.4, NaCl 750 mM]. In alternativa è stato usato un buffer di lisi contenente una minore percentuale di NP40, come l'EBC.

4.6.6 SDS-gel elettroforesi

I lisati cellulari sono stati addizionati con la soluzione LB 2X e, prima di essere caricati in gel di acrilammide, incubati a 100°C per 5 minuti.

Per l'analisi delle proteine sono stati preparati minigel di acrilammide dello spessore di 1.5 mm o gel ProteaII (Bio-rad) dello spessore di 0.75 mm come da ricetta:

- Gel di impaccamento al 4,5% (p/v) costituito da 4 ml di Tris-HCl 0.5 M, pH
 6.8, 2.4 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v), 160 µl di
 SDS 10% (p/v), 20 µl di N, N, N', N'-tetra-metil-etilenediammina, TEMED,
 80 µl di ammonio persolfato, APS 10% (p/v) e portato al volume finale di
 16.06 ml con acqua deionizzata;
- Gel di corsa al 10% (o al 5%) (p/v) costituito da 12.5 ml di Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 16.6 ml (8.8 ml per il gel al 5%) della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v), 500 µl di SDS 10% (p/v), 40 µl di TEMED e 200 µl di APS 10% (p/v) e portato al volume finale di 50 ml con acqua deionizzata.

La migrazione elettroforetica è stata effettuata in presenza di un tampone di corsa (3.02 g di Tris, 14.4 g di glicina, 10 ml di SDS 10% (p/v) e acqua distillata per raggiungere il volume di 1 litro) con un'intensità di corrente costante come riportato di seguito:

- Minigel: 100 V per 2 ore e 30 minuti
- ProteaII: 70 V per tutta la notte (gel di corsa al 10%)

 $120 \text{ V} \rightarrow 150 \text{ V}$ per 7 ore (gel di corsa al 5%)

Tutti i reagenti utilizzati sono Bio-rad.

4.6.7 Immunoblotting

Le proteine separate in gel elettroforesi sono state trasferite elettricamente, su di una membrana di nitrocellulosa (Hybond-C, Amersham LIFE SCIENCE), precedentemente idratata in acqua deionizzata ed equilibrata in tampone di trasferimento (tampone di corsa, privo di SDS, ma addizionato con metanolo al 20% o al 5%, nel caso di gel in cui il trasferimento è stato prolungato per tutta la notte). Il trasferimento è stato effettuato a 50 V per 2 ore o 17 V overnight. Successivamente, per saturare i siti aspecifici, la membrana di nitrocellulosa è stata fatta incubare in una soluzione costituita da latte scremato 5% (p/v) (Sigma), Tween-20 0.1% (Sigma) e PBS1X. In seguito, la membrana è stata immersa in una soluzione contenente l'anticorpo specifico per le proteine oggetto di analisi ed incubata per una notte a 4°C, in agitazione. Di seguito è riportata una tabella (Tabella 2) che riassume gli anticorpi impiegati e le modalità di utilizzo.

Anticorpo primario	Diluizione di utilizzo
Monoclonale di topo α-Flag (Sigma)	1:2000
Monoclonale di topo α-HA (Covance)	1:1000
Policlonale di coniglio α-ubiquitina (Sigma)	1:100
Policlonale di coniglio α-VP1-3/146 Gentilmente concesso dal Prof. Minson (University of Cambridge, UK)	1:5000
Policlonale di coniglio α-VP1-3/147 Gentilmente concesso dal Prof. Minson (University of Cambridge, UK)	1:5000

Tabella 2. Anticorpi primari utilizzati e loro principali caratteristiche.

Dopo trattamento con l'anticorpo primario, la membrana è stata sottoposta a tre lavaggi con PBS-T (PBS 1X, Tween-20 0.1%), ed è stata nuovamente incubata per un'ora con l'anticorpo secondario anti-IgG di coniglio o anti-IgG di topo, coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (Amersham Pharmacia Biotech), diluito 1:5000 in latte scremato 5% (p/v) e PBS-T. Infine, la membrana è stata immersa in una soluzione di sviluppo utilizzando il kit per la rilevazione della chemioluminescenza *ECL plus Western Blotting Detection System* (Amersham Biosciences); successivamente è stata esposta su lastra fotografica (Kodak Biomax Mr Film). Inoltre, il gel di poliacrilammide è stato colorato con Blu di Coomassie (0.05 g di Blu di Coomassie (Sigma), 40 ml di metanolo, 10 ml di acido acetico e acqua distillata per raggiungere il volume di 100 ml) e decolorato con una soluzione di metanolo 40% e acido acetico glaciale 10%.

4.6.8 Immunocitofluorescenza indiretta

Il giorno precedente la trasfezione, sono state seminate $1,5x10^5$ cellule 293T su una piastra da sei pozzetti (Costar) sul cui fondo sono stati deposti vetrini portaoggetti sterili, in DMEM con 10% (v/v) di FBS, senza antibiotici in un volume finale 2 ml.

Tali vetrini sono stati pretrattati con una soluzione di Poli-Lisina (0.1 mg/ml, Sigma) per favorire l'adesione delle cellule. Trascorse 24 ore, quando le cellule presentavano una confluenza del 60-80%, si è proceduto alla trasfezione *in vitro*. Dopo un opportuno intervallo di tempo, i vetrini sono stati lavati in PBS1X e le cellule sono state fissate in una soluzione di acetone e metanolo in rapporto 1:1 incubandole per 5 minuti a -20°C. Successivamente i vetrini sono stati incubati con BSA3%-PBS1X per 30 minuti a temperatura ambiente e, quindi, con l'anticorpo primario diluito in BSA3%-PBS1X per 1 ora e 30 minuti, in camera umida a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi in PBS1X, i vetrini sono stati lavati in acqua, coperti con una goccia di soluzione di montaggio [glicerolo 90% (v/v) in PBS, N-propilgallato 0.2% (p/v)] (Vectashield H-1000, Vector Laboratories) ed analizzati al microscopio a confocale con obiettivo 63X ad immersione (LEICA DM IRBE).

Di seguito è riportata una tabella (Tabella 3) che riassume gli anticorpi impiegati e le modalità di utilizzo:

Anticorpo Secondario	Diluizione di utilizzo
Monoclonale di topo α-Flag (Sigma)	1:250
Monoclonale di coniglio α-LAMP-1 (Santa-Cruz)	1:50
Anticorpo Secondario	Diluizione di utilizzo
Policlonale di capra α-IgG di coniglio Alexa Fluor 568 (Invitrogen)	1:500
Policlonale di capra α-IgG di coniglio coniugato a fluoresceina isotiocianato (FITC) (Sigma)	1:500
Policlonale di capra α-IgG di topo coniugato a fluoresceina isotiocianato (FITC) (Sigma)	1:500

Tabella 3. Anticorpi primari e secondari utilizzati nel saggio di immunocitofluorescenza indiretta.

5. RISULTATI

5.1 Premessa

Durante le fasi terminali del proprio ciclo replicativo, numerosi virus a RNA dotati di envelope utilizzano le membrane di particolari organelli cellulari, i multivesicular bodies (MVB), come base per l'acquisizione del proprio rivestimento lipidico e la gemmazione dalla cellula infetta^{11, 56}. Studi recenti hanno messo in evidenza come tale strategia possa essere comune anche ai virus a DNA dotati di envelope¹⁵, in particolar modo per quel che riguarda l'herpes simplex virus di tipo 1 (HSV-1)^{10, 19}. A tal proposito, è stato dimostrato che, bloccando il *pathway* di biogenesi dei MVB mediante l'utilizzo di forme dominanti negative della proteina Vps4, si verifica una netta riduzione nella produzione di particelle virali infettive^{10, 19}. Inoltre, è stato dimostrato che sussiste un'evidente relazione tra i MVB e una delle più importanti glicoproteine di HSV-1, la glicoproteina B. Infatti, quest'ultima, non solo si accumula a livello delle membrane dei MVB, ma, la sua corretta maturazione e localizzazione intracellulare dipendono strettamente dall'efficienza nella biogenesi di tali organelli. Oltre a ciò, gB risulta ubiquitinata mediante il residuo di lisina K63, generalmente responsabile dell'introduzione di una proteina nel pathway endociticolisosomale, e, mutanti deleti della coda citoplasmatica di gB, bersaglio dell'ubiquitinazione, sono gravemente danneggiati nelle fasi finali di acquisizione dell'envelope e gemmazione¹⁰. Data la fitta rete di interazioni che guidano l'assemblaggio della particella virale di HSV-1, abbiamo ipotizzato che la localizzazione di gB ai MVB potesse non essere un fenomeno isolato. In particolar modo, l'attenzione è stata rivolta alle proteine del tegumento, elemento di connessione tra le varie componenti strutturali virali. Un coinvolgimento comune delle glicoproteine e delle proteine del tegumento nel pathway dei MVB, infatti, potrebbe fornire nuova forza all'interpretazione di tali organelli come struttura cellulare di base non solo per la gemmazione, ma anche per l'assemblaggio definitivo della particella virale.

5.2 Identificazione di Late domain nelle proteine del tegumento di HSV-1

Com'è noto, una delle strategie impiegate dai virus per accedere al *pathway* dei MVB è basata sulla presenza di particolari sequenze aminoacidiche, note come *Late domain* (*L-domain*), all'interno delle proprie proteine strutturali⁵⁶. Di conseguenza, mediante analisi bioinformatiche, si è proceduto all'individuazione di eventuali sequenze corrispondenti a potenziali *L-domain* nelle proteine del tegumento di HSV-1. I risultati di tale ricerca hanno evidenziato la presenza di simili domini in due proteine essenziali nel ciclo replicativo virale: VP1/2, codificata dal gene UL36, e VP16, codificata dal gene UL48 (Figura 9).

VP1/2(UL36)

 ${\tt PRDVLSAEAIEGCLVEGGEWTRATAGPGPPRMCSIVELPNFLEYPGARGGLRCVFSRVYGEVGFFGEPAAGLLETQCPAH}$ ${\tt TFFAGPWALRPLSYTLLTIGPLGMGLFRDGDTAYLFDPHGLPEGTPAFIAKVRAGDMYPYLTYYTRDRPDVRWAGAMVFF}$ VPSGPEPAAPADLTAAALHLYGASETYLQDEAFSERRVAITHPLRGEIAGLGEPCVGVGPREGVGGPGPHPPTAAQSPPP $TRARRDDRASETSRGTAGPSAKPEAKRPNRAPDDVWAVALKGTPPTDPPSADPPSADPPSAIPPPP\frac{PSAP}{KTPAAEAAEE}$ ${\tt DDDDMRVLEMGVVPVGRHRARYSAGLPKRRPTWTPPSSVEDLTSGEKTKRSAPPAKTKKKSTPKGKTPVGAAVPASVPE}$ ${\tt PVLASAPPDPAGPPVAEAGEDDGPTVPASSQALEALKTRRSPEPPGADLAQLFEAHPNVAATAVKFTACSAALAREVAAC$ SRLTTSALRSP LELCVIFFFERVLAFLIENGARTHTQAGVAGPAAALLEFTLNMLPWKTAVGDFLASTRLSLA $\label{eq:construction} DVAAHLPLVQHVLDENSLIGRLALAKLILVARDVIRETDAFYGELADLELQLRAAPPANLYTRLGEWLLERSQAHPDTLF$ APATPTHPEPLI, YRVOALAKFARGEETRVEAEDROMREALDALARGVDAVSOHAGPLGVMPAPAGAAPOGAPRPPPLGPE AVQVRLEEVRTQARRAIEGAVKEYFYRGAVYSAKALQASDNNDRRFHVASAAVVPVVQLLESLPVFDQHTRDIAQRAAIP ${\tt APPPIATSPTAILLRDLIQRGQTLDAPEDLAAWLSVLTDAANQGLIERKPLDELARSIRDINDQQARRSSGLAELRRFDA}$ PRDDFRRLPSPQSSPAPPDATAPRPPASSRASAASSSGSRARRHRRARSLARATQASATTQGWRPPALPDTVAPVTDFAR ${\tt PPAPPKPPEPAPHALVSGVPLPLGPQAAGQASPALPIDPVPPVATGTVLPGGENRPPLTSGPAPTPPRVPVGGPQRRL}$ TRPAVASLSESRESLPSPWDPAD<mark>PTAP</mark>VLGRNPAEPTSSSPAGPSPPPPAVQPVAPPPTSGP<mark>PPTY</mark>LTLEGGVAPGGPVS OPOPOPOPOPOPOPOPOPONGHVAPGEYPAVRFRAPONRPSVPASASSTNPRTGSSLSGVSSWASSLALHIDATPPPVSL ${\tt LOTLYVSDDEDSDATSLFLSDSEAEALDPLPGEPHSPITNEPFSALSADDSQEVTRLQFGPPPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGPVSANAVLSRRYVQRTGPVSANAVLSRRYVQRTGRPVSANAVLSRRYVQRTGPVSANAVLSRRYVQRTGPVSANAVLSRRYVQRTGPVSANAVLSRRYVQRTGPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAVLSRPVSANAV$ SALAVLIRACYRLOOOLORTRRALLHHSDAVLTSLHHVRMLLG

VP16 (UL48)

MDLLVDELFADMNADGASPPPPRPAGGPKNTPAAPPLYATGRLSQAQLMPSPPMPVPP AALFNRLLDDLGFSAGPALCTMLDTWNEDLFSALPTNADLYRECKFLSTLPSDVVEWG DAYVPERTQIDIRAHGDVAFPTLPATRDGLGLYYEALSRFFHAELRARESYRTVLANF CSALYRYLRASVRQLHRQAHMRGRDRDLGEMLRATIADRYYRETARLARVLFLHLYL FLTREILWAAY AEQMMRPDLFDCLCCDLESWRQLAGLFQPFMFVNGALTVRGVPIEAR RLRELNHIREHLNLPLVRSAATEEPGAPLTTPPTLHGNQARASGYFMVLIRAKLDSYSSF TTSPSEAVMREHAYSRARTKNNYGSTIEGLLDLPDDDAPEEAGLAAPRLSFLPAGHTRR LSTAPPTDVSLGDELHLDGEDVAMAHADALDDFDLDMLGDGDSPGPGFTPHDSAPYG ALDMADFEFEQMFTDALGIDEYGG

Figura 9. Sequenza aminoacidica parziale delle proteine del tegumento di HSV-1 VP1/2 e VP16 in cui sono stati evidenziati gli *L-domain* presenti: P(T/S)AP (giallo), YPxL (verde) e PPxY (azzurro).

Com'è stato evidenziato in figura 9, la proteina VP1/2 presenta ben cinque *L-domain*, appartenenti alle tre principali classi note. Più precisamente, due motivi P(T/S)AP, due motivi YPxL ed un solo motivo PPxY riconosciuti, rispettivamente, dalla proteina Tsg101 del complesso ESCRT-I, dal fattore di congiunzione tra i complessi ESCRT-I ed ESCRT-III AIP1 ed, infine, dalle WW ubiquitino-ligasi della famiglia Nedd4. Il motivo PPxY corrisponde anche all'unico dominio presente nella proteina VP16.

E' interessante notare che anche gli omologhi di UL36 nel citomegalovirus umano (UL48) e nell'herpesvirus umano di tipo 8 (ORF64), rispettivamente un *Betaherpesvirus* e un *Gammaherpesvirus*, presentano a propria volta sequenze codificanti *L-domain* al loro interno. Tale aspetto suggerisce che il coinvolgimento del *pathway* dei MVB nel ciclo replicativo virale possa essere in realtà generalizzato a tutte le sottofamiglie degli *Herpesviridae* così come il ruolo di primo piano assunto in tale meccanismo dalle proteine del tegumento erpetico, come da noi supposto nel caso di HSV-1.

5.3 Ottenimento di costrutti esprimenti le forme tronche di VP1/2: pcDNAUL36₁₋₁₅₉₉ 5'Flag e pcDNAUL36₁₋₂₃₀₁ 5'Flag

Come già descritto precedentemente, VP1/2 presenta ben tre tipologie differenti di *L-domain*. Tuttavia, nel presente lavoro, si è deciso di studiare in modo dettagliato il possibile ruolo funzionale della sequenza PSAP presente all'estremità N-terminale della proteina stessa, data l'importanza assunta dall'interazione tra tale dominio e il corrispondente *partner* cellulare Tsg101 nel ciclo replicativo dei virus a RNA dotati di *envelope* e, in particolar modo, dei retrovirus, quali HIV-1³⁰.

Sulla base di quanto riportato in letteratura, inizialmente sono state clonate due forme tronche di UL36, tali da mantenere inalterate alcune delle funzioni fisiologiche della proteina *wild-type*, quali, ad esempio, l'attività deubiquitinasica presente nei primi 500 aminoacidi del polipeptide e la capacità d'interagire con le altre proteine del tegumento^{44, 101}.

Il primo frammento corrisponde alla sequenza nucleotidica compresa tra le basi 1 e 1599 (UL 36_{1-1599}), mentre il secondo a quella compresa tra i nucleotidi 1 e 2301 (UL 36_{1-2301}). Entrambi presentano la sequenza codificante l'*L-domain* PSAP d'interesse (compresa tra i nucleotidi 1159 e 1170), ma il secondo, a differenza del

primo, contiene anche la sequenza codificante il motivo YPASPGL (compresa tra i nucleotidi 1714 e 1734), così da consentire di verificare eventuali effetti reciproci di un dominio rispetto all'altro. Infine, ad entrambi è stato addizionato l'epitopo Flag all'estremità 5' così da facilitarne l'individuazione negli esperimenti successivi.

La strategia di clonaggio adottata è stata la medesima in entrambi i casi. Le sequenze d'interesse sono state amplificate mediante PCR a partire da un plasmide contenente il gene UL36 (pEP36). Nella reazione sono state utilizzate opportune coppie di oligonucleotidi innesco in cui l'oligonucleotide senso conteneva la sequenza codificante l'epitopo Flag (Tabella 1). I prodotti di PCR, quindi, sono stati poliadenilati e inseriti nel vettore di espressione eucariotica pcDNA3.1/V5-His/TOPO. Tuttavia, a causa dei limitati livelli di espressione proteica manifestati da tale costrutto, si è deciso di trasferire la sequenza d'interesse all'interno del plasmide pcDNA3.1+. I frammenti dunque sono stati estratti mediante restrizione enzimatica con le endonucleasi HindIII ed EcoRV e ligati nel vettore pcDNA3.1+ precedentemente linearizzato con i medesimi enzimi. I plasmidi così ottenuti sono stati denominati pcDNAUL36₁₋₁₅₉₉ 5'Flag e pcDNAUL36₁₋₂₃₀₁ 5'Flag e codificano, rispettivamente, per le seguenti due forme tronche di VP1/2: VP1/2₁₋₅₃₃ 5'Flag e VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag.

L'espressione dei costrutti risultati corretti è stata valutata in seguito a trasfezione di cellule 293T. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate nel tampone di lisi RIPA 1X e le proteine presenti nei campioni così ottenuti sono state separate mediante SDS-gel elettroforesi e analizzate mediante immunoblotting utilizzando un anticorpo anti-Flag. Entrambe le proteine espresse, caratterizzate da una massa apparente pari rispettivamente a 68 e 90 kDa, sono risultate corrette, così come evidenziato in figura 10.



Figura 10. Espressione di VP1/2₁₋₅₃₃ 5'Flag e VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag. Cellule 293T sono state trasfettate con i plasmidi esprimenti le forme tronche della proteina VP1/2: pcDNAUL36₁₋₁₅₉₉ 5'Flag e pcDNAUL36₁₋₂₃₀₁ 5'Flag. Dopo 48 ore, i prodotti dei lisati cellulari sono stati separati in SDS-PAGE e analizzati in immunoblot utilizzando un anticorpo anti-Flag. C: cellule non trasfettate.

5.4 Localizzazione intracellulare di VP1/2₁₋₅₃₃ 5'Flag e VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag mediante immunocitofluorescenza indiretta

Sulla base di quanto osservato per la glicoproteina gB^{10} e verificata la presenza di molteplici *L-domain* nella proteina VP1/2, abbiamo deciso di accertare se anche quest'ultima localizzasse a livello dei MVB e, utilizzando le forme tronche precedentemente descritte, se tale localizzazione potesse essere attribuita specificamente ad uno dei domini in esse presenti.

Cellule 293T sono state trasfettate coi costrutti pcDNAUL36₁₋₁₅₉₉ 5'Flag o pcDNAUL36₁₋₂₃₀₁ 5'Flag e, a 24 ore dalla trasfezione, infettate con HSV-1 ad una m.o.i. pari a 3 unità formanti placca (PFU/cellula). L'infezione si è resa necessaria in quanto la visualizzazione e il riconoscimento dei MVB mediante microscopia confocale risultano chiari solamente in tale condizione. Infatti, il virus non solo altera in modo consistente la morfologia dei MVB, rendendoli più allargati, ma ne causa anche un accumulo a livello perinucleare facilitandone l'identificazione¹⁰. A 24 ore dall'infezione, quindi, si è proceduto all'analisi delle cellule mediante immunocitofluorescenza indiretta utilizzando anticorpi specifici anti-Flag (per individuare le forme tronche di VP1/2) e anti-LAMP-1 (per individuare i MVB). In questo modo è stato possibile riscontrare che la localizzazione intracellulare delle

due forme tronche di VP1/2 è nettamente diversa. Nel caso di VP1/2₁₋₅₃₃ 5'Flag, infatti, è stato costantemente osservato che tale proteina tende a rimanere confinata al nucleo cellulare (Fig. 11A-C), non riflettendo quindi la localizzazione citoplasmatica e associata a membrane riportata in letteratura per quel che riguarda la proteina *wild-type*²³. Viceversa, la proteina VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag è sembrata localizzare, almeno parzialmente, a livello delle membrane dei MVB (Fig. 11D-E). Considerando dunque la localizzazione, più coerente rispetto ai dati riportati in letteratura, e il mantenimento di attività fisiologiche simili alla forma intera di VP1/2 relativi al frammento proteico VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag, è stato possibile supporre che i dati ottenuti per quest'ultimo potessero essere estesi anche alla forma *wild-type*. Inoltre, è ipotizzabile che, in questo caso, la localizzazione di VP1/2 ai MVB sia da attribuirsi, almeno in parte, al dominio YPASPGL, assente nel frammento proteico incapace di abbandonare il nucleo cellulare.

Sulla base di quanto appena descritto, negli esperimenti successivi si è deciso di utilizzare esclusivamente la forma tronca $VP1/2_{1-767}$ 5'Flag, presumibilmente più rappresentativa della proteina intera.



Figura 11. Localizzazione intracellulare delle proteine VP1/2₁₋₅₃₃ 5'Flag e VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag. Cellule 293T trasfettate con i plasmidi pcDNAUL36₁₋₁₅₉₉ 5'Flag o pcDNAUL36₁₋₂₃₀₁ 5'Flag ed infettate con HSV-1 ad una m.o.i. 3 dopo 24 ore. A 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state fissate con una soluzione di acetone e metanolo in rapporto 1:1, incubate con gli anticorpi anti-Flag e anti-LAMP-1 e, successivamente, con gli opportuni anticorpi secondari. Le figure 11A e 11D evidenziano la localizzazione della proteina LAMP-1 (MVB), mentre le figure 11B e 11E,

rispettivamente, evidenziano la localizzazione della proteine $VP1/2_{1-533}$ 5'Flag e $VP1/2_{1-767}$ 5'Flag. Infine, le figure 11C e 11F evidenziano contemporaneamente sia la localizzazione della proteina LAMP-1 (MVB) che delle forme tronche della proteina VP1/2 analizzate.

5.5 Analisi delle interazioni di VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag con i corrispondenti *partner* cellulari: Tsg101 ed AIP1

Come già accennato, la presenza di *L-domain* all'interno di specifiche proteine strutturali rappresenta una delle vie principali utilizzate da un virus per accedere al *pathway* dei MVB. Di conseguenza, abbiamo deciso di verificare se le due sequenze riconoscibili come *L-domain* all'interno della proteina VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag potessero effettivamente essere responsabili di interazioni specifiche con fattori coinvolti nella biogenesi dei MVB.

Cellule 293T sono state co-trasfettate con i plasmidi codificanti la forma tronca di VP1/2 e le proteine Tsg101HA e/o AIP1HA, rispettivamente *partner* cellulari dei domini PSAP e YPASPGL presenti in VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag. Dopo 48 ore, i relativi lisati cellulari, prodotti in tampone RIPA 1X, sono stati sottoposti a co-immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo per l'epitopo Flag. I campioni così ottenuti sono stati separati mediante SDS-PAGE e quindi analizzati tramite western blot utilizzando un anticorpo anti-HA o un anticorpo anti-Flag rispettivamente per rilevare la proteina co-immunoprecipitata o verificare la presenza di VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag (Fig. 12A e 12B). Dall'analisi della figura 12 risulta evidente che VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag interagisce direttamente con Tsg101HA, mentre AIP1HA viene co-immunoprecipitata in modo aspecifico, almeno nelle nostre condizioni sperimentali; tale dato, tuttavia, proprio perché falsato da simili condizioni, non esclude necessariamente una possibile interazione tra le due proteine.



Figura 12. Analisi delle interazioni tra VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag e i relativi *partner* cellulari, Tsg101HA e AIP1HA. Cellule 293T sono state co-trasfettate coi costrutti esprimenti VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag, Tsg101HA e/o AIP1HA. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate e VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag è stata immunoprecipitata con un anticorpo per l'epitopo Flag. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e analizzate in western blot utilizzando un anticorpo per l'epitopo HA (A) o Flag (B). Nelle figure è stata evidenziata la presenza di Tsg101HA (A) e di VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag (B).

5.6 Ottenimento del costrutto esprimente VP1/2 5'Flag: pcDNAUL36 5'Flag

Allo scopo di ottenere delle informazioni complete sul *Late-domain* PSAP in esame, abbiamo deciso di ripetere il saggio di co-immunoprecipitazione appena descritto anche con la proteina VP1/2 nella sua completezza. Per far questo è stato necessario innanzitutto clonare la sequenza genica UL36 all'interno di un vettore di espressione eucariotico sotto il controllo di un promotore forte, quale quello del citomegalovirus, in grado di garantire gli elevati livelli di espressione proteica richiesti nei saggi di co-immunoprecipitazione. Inoltre, si è dovuta arricchire la sequenza codificante la proteina con un epitopo Flag, così da permetterne l'individuazione mediante immunoblotting.

Il plasmide pKXSB, contenente le sequenze dei geni UL33, UL34, UL35, UL36 e, parzialmente, UL37, è stato digerito, così come il costrutto pcDNAUL36₁₋₂₃₀₁ 5'Flag, con gli enzimi KpnI/XbaI. Tuttavia, dato che il plasmide pcDNAUL36₁₋₂₃₀₁ 5'Flag

presenta un duplice sito di taglio per l'enzima KpnI, uno interno al gene UL36, utile al clonaggio, e uno nel vettore, per produrre il costrutto finale è stato necessario eliminare preventivamente il sito interno al vettore mediante mutagenesi sitospecifica. I frammenti derivanti dalla digestione enzimatica, quindi, sono stati ligati così da ottenere il plasmide definitivo pcDNAUL36 5'Flag.

La strategia di clonaggio è schematizzata in figura 13.



Figura 13. Rappresentazione schematica del clonaggio di pcDNAUL36 5'Flag. I costrutti pKXSB e pcDNAUL36₁₋₂₃₀₁ 5'Flag (dopo opportuna mutagenesi per eliminare il sito KpnI esterno al gene UL36) sono stati sottoposti a restrizione enzimatica con la coppia di enzimi XbaI e KpnI. I frammenti d'interesse, una volta purificati, sono stati ligati così da ottenere il plasmide definitivo.

Per valutarne l'efficienza d'espressione, il costrutto pcDNAUL36 5'Flag è stato trasfettato in cellule 293T. Allo scopo di verificare se i livelli di espressione di VP1/2 5'Flag dipendessero da eventuali fattori virali, la trasfezione è stata fatta seguire o meno da infezione con HSV-1 con una m.o.i. pari a 30. A 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state lisate in tampone RIPA 1X e le proteine presenti nei campioni così ottenuti sono state separate mediante SDS-gel elettroforesi e analizzate mediante immunoblotting utilizzando un anticorpo anti-VP1/2 o un anticorpo anti-Flag (Fig. 14A e 14B). Come si può vedere dall'immagine 14, l'espressione della proteina

d'interesse, in seguito alla sola trasfezione, è risultata paragonabile a quella ottenuta in seguito ad infezione e non è stata modificata dalla copresenza di altri fattori virali. L'immagine, infine, evidenzia che la proteina presenta numerosi prodotti di degradazione, alcuni già noti dalla letteratura^{42, 44}, altri potenzialmente interessanti e dotati di attività e funzioni specifiche.



Figura 14. Espressione della proteina VP1/2 5'Flag. Cellule 293T sono state trasfettate col costrutto codificante VP1/2 5'Flag, infettate con HSV-1 m.o.i. 30 o trasfettate e infettate. Dopo 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state lisate e le proteine, separate mediante SDS-PAGE, sono state analizzate in western blot utilizzando un anticorpo per la proteina VP1/2 (A) o per l'epitopo Flag (B). C: cellule 293T non trasfettate, né infettate. HSV-1: cellule solo infettate.

5.7 Localizzazione intracellulare di VP1/2 5'Flag mediante immunocitofluorescenza indiretta

Una volta ottenuto il costrutto codificante la proteina VP1/2 addizionata dell'epitopo Flag, è stata valutata la sua localizzazione intracellulare analogamente a quanto precedentemente descritto. Cellule 293T sono state trasfettate col costrutto pcDNAUL36 5'Flag e infettate con HSV-1 ad una m.o.i. pari a 3 unità formanti placca (PFU/cellula) a 24 ore dalla trasfezione. A 48 ore dall'infezione, quindi, si è proceduto all'analisi delle cellule mediante immunocitofluorescenza indiretta

utilizzando anticorpi specifici anti-Flag (per individuare la proteina VP1/2) e anti-LAMP-1 (per individuare i MVB). Così come supposto, la proteina VP1/2 5'Flag localizza almeno parzialmente ai MVB (Fig. 15), in modo molto simile a quanto osservato per la relativa forma tronca VP1/2 ₁₋₇₆₇ 5'Flag (Fig. 11F). La localizzazione ai MVB, da noi già attribuita, almeno in parte, al dominio YPASPGL, potrebbe essere ulteriormente rafforzata dagli altri *L-domain* presenti nella proteina intera. Tuttavia, solo una futura analisi mirata di ciascuno di tali motivi potrà consentire la verifica di una simile ipotesi.



Figura 15. Localizzazione intracellulare della proteina VP1/2 5'Flag. Cellule 293T trasfettate con il plasmide pcDNAUL36 5'Flag ed infettate, dopo 24 ore, con HSV-1 ad una m.o.i. 3. A 48 ore dall'infezione, le cellule sono state fissate con una soluzione di acetone e metanolo in rapporto 1:1, incubate con gli anticorpi anti-Flag e anti-LAMP-1 e, successivamente, con gli opportuni anticorpi secondari. Le figure evidenziano la localizzazione della proteina LAMP-1 (MVB) in rosso (A), quella della proteina VP1/2 5'Flag in verde (B) e la loro parziale co-localizzazione (C).

5.8 Analisi delle interazioni di VP1/2 5'Flag con Tsg101HA

Una volta ottenuto il costrutto pcDNAUL36 5'Flag, abbiamo ripetuto l'esperimento di co-immunoprecipitazione descritto precedentemente allo scopo di confermare quanto già evidenziato con la forma tronca VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag.

Cellule 293T quindi sono state co-trasfettate con i plasmidi codificanti le proteine VP1/2 5'Flag e Tsg101HA. Dopo 48 ore, i relativi lisati cellulari, prodotti in tampone RIPA 1X, sono stati sottoposti a co-immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo per l'epitopo Flag e i campioni così ottenuti sono stati separati mediante SDS-PAGE e quindi analizzati tramite western blot utilizzando un anticorpo anti-HA (Fig. 16). In effetti, i risultati della co-immunoprcipitazione eseguita hanno confermato i dati ottenuti precedentemente, in particolar modo l'interazione specifica

tra VP1/2 5'Flag e Tsg101HA, in questo caso accentuata dal fatto che la forma intera della proteina possiede due domini di tipo P(T/S)AP in grado d'interagire con Tsg101.



 $\text{Co-IP} \rightarrow \text{Ab} \; \alpha \text{-} \text{Flag} \qquad \text{WB} \rightarrow \text{Ab} \; \alpha \text{-} \text{HA}$

Figura 16. Analisi delle interazioni tra VP1/2 5'Flag e Tsg101HA. Cellule 293T sono state cotrasfettate coi costrutti esprimenti VP1/2 5'Flag e Tsg101HA. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate e VP1/2 5'Flag è stata immunoprecipitata con un anticorpo per l'epitopo Flag. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e analizzate in western blot utilizzando un anticorpo per l'epitopo HA. Nella figura è stata evidenziata la presenza di Tsg101HA.

5.9 Valutazione degli effetti delle mutazioni del dominio PSAP di VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag nell'interazione con Tsg101HA

Vari studi presenti in letteratura hanno messo in luce l'importanza dei domini di tipo P(T/S)AP e della loro interazione con la proteina Tsg101 nelle fasi finali del ciclo replicativo di diversi virus a RNA dotati di *envelope*, in particolar modo di HIV-1. Inoltre, è stato dimostrato che mutazioni puntiformi a carico di uno qualunque degli

aminoacidi costituenti l'*L-domain* in questione abolisce la funzione di tale dominio e blocca la gemmazione virale in uno stadio molto avanzato^{30, 38}.

Sulla base di quanto appena riportato, dunque, abbiamo deciso di modificare la sequenza PSAP, presente nella forma tronca della proteina VP1/2, mediante mutagenesi sito-specifica. Sono state introdotte due differenti mutazioni. In un caso la prima prolina dell'*L-domain* è stata sostituita con un'alanina (PSAP \rightarrow ASAP), nel secondo caso, invece, entrambi i primi due aminoacidi sono stati convertiti in alanine (PSAP \rightarrow AAAP), così da ottenere i costrutti pcDNAUL36₁₋₂₃₀₁ 5'Flag MUT IA e pcDNAUL36₁₋₂₃₀₁ 5'Flag MUT (IA + IB). Allo scopo di valutare eventuali effetti sull'interazione di VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag con Tsg101HA da noi evidenziata, cellule 293T sono state co-trasfettate con i costrutti codificanti ciascuna delle forme mutanti di VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag e Tsg101HA. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate in tampone RIPA 1X e i campioni risultanti sono stati innanzitutto sottoposti a co-immunoprecipitazione con un anticorpo anti-Flag e successivamente analizzati in immunoblotting utilizzando un anticorpo anti-HA.

Come è possibile evincere dalla figura 17, nessuna delle due mutazioni introdotte ha causato l'abrogazione della funzionalità del dominio PSAP in quanto Tsg101HA continua ad essere immunoprecipitata in modo specifico. Questo dato è piuttosto interessante in quanto, discostandosi nettamente da quanto pubblicato finora relativamente al funzionamento dei domini di tipo P(T/S)AP nei virus a RNA dotati di *envelope*, suggerisce una potenziale differenza nella reinterpretazione degli *L-domain* da parte dei virus a DNA rispetto ai corrispondenti virus a RNA.



Co-IP \rightarrow Ab α -Flag WB \rightarrow Ab α -HA

Figura 17. Analisi delle interazioni tra le forme mutate di VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag e Tsg101HA. Cellule 293T sono state co-trasfettate coi costrutti esprimenti VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag MUT IA o VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag MUT (IA + IB) e Tsg101HA. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate e VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag è stata immunoprecipitata con un anticorpo per l'epitopo Flag. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e analizzate in western blot utilizzando un anticorpo per l'epitopo HA. Nella figura è stata evidenziata la presenza di Tsg101HA.

5.10 Localizzazione intracellulare di VP16-GFP mediante immunocitofluorescenza indiretta

Data la presenza dell'*L-domain* PPLY e l'importanza di VP16 nella replicazione di HSV-1, sia da un punto di vista strutturale che funzionale, abbiamo deciso di verificare se anche tale proteina localizzasse a livello dei MVB. In questo caso cellule 293T sono state infettate con il virus ricombinante HSV-1 V41, codificante una proteina VP16 fusa *in frame* con la proteina fluorescente GFP, ad una m.o.i. pari a 3 unità formanti placca (PFU/cellula). Dopo 24 ore, le cellule sono state fissate e analizzate al microscopio confocale. In questo caso, dato che la proteina VP16
risultava immediatamente rilevabile grazie alla GFP, è stato sufficiente utilizzare un anticorpo anti-LAMP-1 così da indicare la localizzazione dei MVB. Come evidenziato dalla figura 18, anche VP16, così come VP1/2₁₋₇₆₇ 5'Flag è risultata localizzare, almeno parzialmente, a livello delle membrane dei MVB.



Figura 18. Localizzazione intracellulare della proteina VP16-GFP. Cellule 293T sono state infettate con il virus ricombinante HSV-1 V41 ad una m.o.i. 3. Dopo 24 ore dall'infezione, le cellule sono state fissate con una soluzione di acetone e metanolo in rapporto 1:1, incubate con l'anticorpo anti-LAMP-1 e, successivamente, con l'opportuno anticorpo secondario. Le figure evidenziano rispettivamente la localizzazione delle proteine LAMP-1 (MVB) (A), VP16-GFP (B) e la loro co-localizzazione (C).

5.11 Ottenimento dei costrutti esprimenti la proteina VP16 fusa agli epitopi HA o Flag: pBJ5-HAVP16 e pBJ5-FlagVP16

Successivamente, in modo analogo a quanto già riportato per la proteina VP1/2, abbiamo deciso di indagare possibili interazioni tra l'*L-domain* presente in VP16 e il corrispondente *partner* cellulare che ne potessero giustificare la localizzazione intracellulare. Per portare a termine i successivi esperimenti di co-immunoprecipitazione, quindi, è stato necessario ottenere dei costrutti codificanti la proteina VP16 fusa ad un epitopo facilmente rilevabile, quale il Flag o l'HA. Mediante PCR, dunque, si è proceduto all'amplificazione della sequenza codificante VP16 a partire da DNA virale genomico estratto da cellule 293T infettate con HSV-1. Nella reazione sono state utilizzate opportune coppie di oligonucleotidi innesco in cui l'oligonucleotide senso conteneva a valle del codone d'inizio della traduzione la sequenza codificante l'epitopo Flag o HA. Inoltre, ciascun oligonucleotide era stato disegnato in modo tale da presentare specifici siti di taglio immediatamente alle estremità della sequenza codificante. In particolar modo il sito riconosciuto dall'enzima di restrizione NotI, per quel che riguardava l'oligonucleotide senso, e quello riconosciuto dall'enzima di restrizione EcoRI, per quel che riguardava

l'oligonucleotide antisenso (Tabella 1). Ad amplificazione avvenuta, i prodotti di PCR sono stati purificati e digeriti con gli enzimi indicati. I frammenti così ottenuti infine sono stati purificati e ligati nel vettore pBJ5, a propria volta già linearizzato mediante restrizione con i medesimi enzimi.

I costrutti definitivi pBJ5-HAVP16 e pBJ5-FlagVP16 sono stati successivamente trasfettati in cellule 293T, al fine di valutarne l'espressione. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate in tampone RIPA 1X e i campioni così ottenuti sono stati analizzati in immunoblotting utilizzando un anticorpo anti-HA (Fig. 19A) o anti-Flag (Fig. 19B). In entrambi i casi le proteine individuate sono risultate corrispondenti a quelle attese.



Figura 19. Espressione di VP16 5'HA e VP16 5'Flag. Cellule 293T sono state trasfettate con i plasmidi esprimenti la proteina VP16 addizionata dell'epitopo HA (A) o Flag (B). Dopo 48 ore, i prodotti dei lisati cellulari sono stati separati in SDS-PAGE e analizzati in immunoblot utilizzando un anticorpo anti-HA (A) o anti-Flag (B). C: cellule non trasfettate.

5.12 Analisi dell'ubiquitinazione di VP16

Il fattore di transattivazione trascrizionale VP16 presenta all'interno della propria sequenza un unico *L-domain* di tipo PPxY. Com'è noto i *partner* cellulari corrispondenti a tale motivo aminoacidico sono rappresentati dai membri della famiglia delle ubiquitino-ligasi Nedd4, in particolar modo WWP1, WWP2 e AIP4^{56, 93}. Tenendo conto della natura del dominio presente nella proteina VP16, nonché dell'importanza dell'ubiquitinazione nel coinvolgimento delle proteine virali nel *pathway* dei MVB, si è deciso di verificare innanzitutto se anche VP16 fosse soggetta ad una simile coniugazione proteica. Cellule 293T, quindi, sono state trasfettate col costrutto pBJ5-FlagVP16, singolarmente o in associazione col costrutto pTL1-HAUb wt codificante la proteina ubiquitina fusa all'epitopo HA.

Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate in tampone EBC e i campioni così ottenuti sono stati sottoposti ad immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo anti-Flag. Le proteine immunoprecipitate successivamente sono state separate in SDS-PAGE e analizzate mediante immunoblotting utilizzando un anticorpo anti-HA (Fig. 20A) o anti-Flag (Fig. 20B). Come si può osservare in figura 20, la proteina VP16, pur essendo stata immunoprecipitata efficientemente (Fig. 20B), non è risultata coniugata all'ubiquitina (Fig. 20A).



Figura 20. Analisi dell'ubiquitinazione di VP16 5'Flag. Cellule 293T sono state trasfettate col costrutto esprimente VP16 5'Flag singolarmente o in associazione al costrutto esprimente l'ubiquitina coniugata all'epitopo HA. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate e la proteina VP16 5'Flag è stata immunoprecipitata con un anticorpo per l'epitopo Flag. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e analizzate in western blot utilizzando un anticorpo per l'epitopo HA (A) o Flag (B). Nella figura 20B è stata evidenziata la presenza di VP16 5'Flag.

Studi riportati in letteratura hanno dimostrato che diverse proteine coinvolte nel *pathway* dei MVB interagiscono con ubiquitino-ligasi di tipo WW senza essere esse stesse bersaglio di ubiquitinazione¹¹. In questo modo, quindi, non è l'ubiquitina ad indirizzare una proteina agli organelli cellulari d'interesse, quanto piuttosto l'interazione fisica con gli enzimi responsabili di tale ubiquitinazione. Abbiamo pertanto supposto che questa condizione potesse verificarsi anche nel caso di VP16.

Di conseguenza, sono stati effettuati degli studi di co-immunoprecipitazione cotrasfettando cellule 293T con il costrutto codificante VP16 5'Flag in associazione coi costrutti codificanti le ubiquitino-ligasi Nedd4-1, Nedd4-2, WWP1 o AIP4, ciascuno addizionato dell'epitopo HA. Tuttavia, in nessuno dei casi analizzati, VP16 5'Flag è sembrata interagire con le ubiquitino-ligasi considerate (dati non riportati). Ciononostante, tale proteina è in grado di localizzare ai MVB, così come dimostrato dalle precedenti analisi di immunocitofluorescenza indiretta. E' dunque possibile ipotizzare che, per essere direzionata al *pathway* dei MVB, VP16 necessiti dell'interazione, più o meno diretta, con altre proteine virali.

5.13 Ottenimento dei costrutti esprimenti le proteine VP13/14 e VP22 fuse all'epitopo Flag: pcUL47 5'Flag e pcUL49 5'Flag

Allo scopo di accertare se effettivamente VP16 necessiti di altre proteine virali per essere direzionata ai MVB, abbiamo deciso di individuare alcuni dei possibili *partner* d'interazione di tale proteina. Da tempo si ritiene che le sequenze codificanti le proteine VP11/12, VP13/14, VP16 e VP22 facciano parte di un *cluster* genico i cui prodotti proteici risultano strettamente correlati tra loro, sia da un punto di vista strutturale che funzionale. A conferma di quanto appena indicato, recenti studi basati su saggi di doppio-ibrido eseguiti in lievito, da un lato hanno evidenziato interazioni dirette di VP16 sia con VP22 che con VP11/12, dall'altro hanno fornito delle prove a favore di una possibile interazione tra VP16 e VP13/14^{48, 101}. Di conseguenza, abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione proprio sui prodotti dei geni UL47 e UL49, rispettivamente VP13/14 e VP22.

In particolar modo, per analizzare l'interazione tra VP16, VP13/14 e VP22 mediante saggi di co-immunpoprecipitazione, è stato necessario ottenere dei costrutti esprimenti tali proteine fuse ad un epitopo Flag che ne facilitasse l'identificazione. Mediante PCR, dunque, si è proceduto all'amplificazione delle sequenze codificanti VP13/14 e VP22 a partire da DNA virale genomico estratto da cellule 293T infettate con HSV-1. Nelle reazioni sono state utilizzate opportune coppie di oligonucleotidi innesco in cui l'oligonucleotide senso conteneva a valle del codone d'inizio della traduzione la sequenza codificante l'epitopo d'interesse. Inoltre, ciascun oligonucleotide era stato disegnato in modo tale da presentare specifici siti di taglio immediatamente alle estremità della sequenza codificante. In particolar modo il sito

riconosciuto dagli enzimi di restrizione NotI ed EcoRI, rispettivamente per l'oligonucleotide senso ed antisenso (Tabella 1). Ad amplificazione avvenuta, i prodotti di PCR sono stati purificati e digeriti con gli enzimi indicati. I frammenti così ottenuti infine sono stati purificati e ligati nel vettore pcDNA3.1+, a propria volta già linearizzato mediante restrizione con i medesimi enzimi.

I costrutti definitivi pcUL47 5'Flag e pcUL49 5'Flag sono stati successivamente trasfettati in cellule 293T, al fine di valutarne l'espressione e ottimizzare le condizioni sperimentali di immunoprecipitazione. Dopo 24 ore, le cellule sono state lisate in tampone RIPA 1X e i campioni così ottenuti sono stati immunoprecipitati utilizzando un anticorpo anti-Flag e analizzati in immunoblotting utilizzando lo stesso anticorpo (Fig. 21). Come evidenziato in figura 21, le proteine d'interesse sono risultate corrette e immunoprecipitate in modo efficiente.



 $\mathsf{IP} \to \alpha\text{-}\mathsf{Flag} \quad \mathsf{WB} \to \alpha\text{-}\mathsf{Flag}$

Figura 21. Espressione di VP13/14 5'Flag e VP22 5'Flag. Cellule 293T sono state trasfettate con i plasmidi esprimenti le proteine VP13/14 e VP22 addizionate dell'epitopo Flag. Dopo 24 ore, i prodotti dei lisati cellulari sono stati sottoposti a immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo anti-Flag, separati in SDS-PAGE e analizzati in immunoblot utilizzando nuovamente il medesimo anticorpo. C: cellule non trasfettate.

5.14 Analisi delle interazioni di VP16 5'HA con VP13/14 5'Flag e VP22 5'Flag

Una volta ottenuti i costrutti d'interesse, le possibili interazioni tra le proteine VP16, VP13/14 e VP22 sono state analizzate mediante co-immunoprecipitazione. Cellule 293T sono state co-trasfettate con il plasmide pBJ5-HAVP16 in associazione con il costrutto pcUL47 5'Flag o pcUL49 5'Flag. A 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state lisate in tampone EBC ed i campioni risultanti sono stati inizialmente sottoposti a co-immunoprecipitazione, utilizzando un anticorpo anti-Flag, e, quindi, analizzati in immunoblotting mediante un anticorpo anti-HA (Fig. 22A) o anti-Flag (Fig. 22B). Come evidenziato in figura 22A, il saggio da noi eseguito ha confermato l'interazione diretta tra le proteine VP16 e VP22, tuttavia non ha evidenziato alcuna relazione fisica tra VP16 e VP13/14, almeno nelle condizioni sperimentali testate.



Figura 22. Analisi delle interazioni tra VP16 5'HA e le proteine VP13/14 5'Flag e VP22 5'Flag. Cellule 293T sono state co-trasfettate coi costrutti esprimenti VP16 5'HA e VP13/14 5'Flag o VP22 5'Flag. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate e le proteine VP13/14 5'Flag e VP22 5'Flag sono state immunoprecipitate con un anticorpo per l'epitopo Flag. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE e analizzate in western blot utilizzando un anticorpo per l'epitopo HA (A) o Flag (B). Nelle figure sono state evidenziate le proteine VP16 5'HA (A), VP13/14 5'Flag (B) e VP22 5'Flag (B).

5.15 Analisi dell'ubiquitinazione di VP22 5'Flag

Data l'interazione tra VP16 e VP22, si è voluto verificare se quest'ultima fosse ubiquitinata e se tale modifica dipendesse proprio dall'interazione con VP16. VP16, infatti, presentando il dominio PPLY, potrebbe fungere da elemento di contatto tra le ubiquitino-ligasi Nedd4 e VP22, così da permettere l'ubiquitinazione di quest'ultima. Cellule 293T, quindi, sono state trasfettate col costrutto codificante VP22 5'Flag singolarmente o in associazione con il plasmide codificante VP16 5'HA. Inoltre, nelle medesime cellule sono stati introdotti dei vettori esprimenti l'ubiquitina o una forma mutante della stessa incapace di polimerizzare, entrambe addizionate dell'epitopo HA. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate nel tampone EBC e i campioni così ottenuti sono stati immunoprecipitati utilizzando un anticorpo anti-Flag. Successivamente, tali campioni sono stati separati mediante SDS-PAGE e analizzati in immunoblotting utilizzando un anticorpo anti-HA.

Come riportato in figura 23, la proteina VP22 5'Flag è risultata essere ubiquitinata in modo specifico, tant'è vero che la coniugazione in esame non è riscontrabile nel campione di controllo presentante la forma mutata dell'ubiquitina. Tuttavia, VP16 non è sembrata essere la responsabile di tale modifica, in quanto i livelli dell'ubiquitinazione sono rimasti inalterati indipendentemente dalla presenza o meno della stessa VP16.



 $\text{Co-IP} \rightarrow \text{Ab} \; \alpha\text{-}\text{Flag} \qquad \text{WB} \rightarrow \text{Ab} \; \alpha\text{-}\text{HA}$

Figura 23. Analisi dell'ubiquitinazione di VP22 5'Flag. Cellule 293T sono state trasfettate con il costrutto codificante VP22 5'Flag singolarmente o in associazione ai costrutti codificanti le proteine ubiquitina *wild type* (pTL1HAUb wt), la forma mutante della stessa (pTL1HAUb K0) e VP16, tutte arricchite dell'epitopo HA all'estremità N-terminale. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate e la proteina VP22 5'Flag è stata immunoprecipitata mediante un anticorpo anti-Flag. Gli immunoprecipitati risultanti sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e western blot utilizzando un anticorpo anti-HA. C: cellule 293T non trasfettate.

5.16 Analisi dell'ubiquitinazione di VP13/14 5'Flag

Nonostante le proteine VP13/14 5'Flag e VP16 5'Flag non interagiscano direttamente tra loro, almeno in base a quanto da noi osservato nei precedenti saggi di co-immunoprecipitazione, abbiamo comunque deciso di verificare se anche VP13/14 5'Flag fosse ubiquitinata e se tale modifica fosse influenzata dalle altre due proteine tegumentarie in esame: VP16 e VP22. Cellule 293T sono state trasfettate con il costrutto codificante VP13/14 5'Flag singolarmente o in associazione con i costrutti codificanti l'ubiquitina fusa all'epitopo HA, VP16 5'HA e/o VP22 5'Flag. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate in tampone RIPA 1X e i campioni così ottenuti sono stati sottoposti a immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo per l'epitopo Flag, separati mediante SDS-PAGE e analizzati in western blot utilizzando anticorpi specifici per gli epitopi HA (Fig. 24A) o Flag (Fig. 24B).



Figura 24. Analisi dell'ubiquitinazione di VP13/14 5'Flag. Cellule 293T sono state trasfettate con il costrutto codificante VP13/14 5'Flag singolarmente o in associazione al costrutto codificante l'ubiquitina arricchita dell'epitopo HA o di tale costrutto e di quelli codificanti VP16 5'HA e/o VP22 5'Flag. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate e la proteina VP13/14 5'Flag è stata immunoprecipitata mediante un anticorpo anti-Flag. Gli immunoprecipitati risultanti sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e western blot utilizzando un anticorpo anti-HA (A) o anti-Flag (B). In figura 24B è stata evidenziata la presenza negli immnuoprecipitati di VP13/14 5'Flag e VP22 5'Flag.

Come si può notare in figura 24A, la proteina VP13/14 5'Flag è risultata effettivamente ubiquitinata. Tuttavia, il suo livello di ubiquitinazione, rimasto pressoché costante in presenza di VP16 5'HA, è diminuito evidentemente in presenza di VP22 5'Flag. Questo aspetto potrebbe trovare due possibili spiegazioni. Da un lato le due proteine, entrambe fuse allo stesso epitopo, durante il saggio di co-immunoprecipitazione, potrebbero competere nel legame all'anticorpo anti-Flag coniugato alle biglie e, quindi, la diminuzione nel livello di ubiquitinazione di VP13/14 5'Flag potrebbe essere attribuita alla minore quantità di proteina

immunoprecipitata, così come evidenziato anche in figura 24B. Dall'altro, tale variazione potrebbe essere dovuta ad un'eventuale interazione tra VP22 5'Flag e VP13/14 5'Flag che potrebbe precludere i residui bersaglio dell'ubiquitinazione all'interno di quest'ultima.

5.17 Identificazione del residuo di lisina coinvolto nell'ubiquitinazione di VP13/14 5'Flag

Come precedentemente descritto, l'ubiquitinazione rappresenta il segnale d'eccellenza nei processi di direzionamento e smistamento di una proteina nello spazio intracellulare e la natura del residuo di lisina coinvolto nella formazione delle catene di poliubiquitina determina se tale proteina debba essere indirizzata ai MVB (lisina K63) o alla degradazione nei proteasomi (lisina K48)⁴⁵.

Una volta verificata l'ubiquitinazione di VP13/14 5'Flag, quindi, abbiamo deciso di identificare la natura del residuo di lisina in essa coinvolto. Cellule 293T sono state co-trasfettate col costrutto codificante VP13/14 5'Flag e con i costrutti codificanti l'ubiquitina *wild type* o mutanti in cui i residui di lisina sono stati sostituiti con residui di arginina in posizione 48, 63 o in modo ubiquitario, tutti addizionati dell'epitopo HA. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate in tampone EBC e i campioni così ottenuti sono stati sottoposti a immunoprecipitazione, utilizzando un anticorpo per l'epitopo Flag, separati mediante SDS-PAGE e analizzati mediante western blot utilizzando anticorpi specifici per l'epitopo HA (Fig. 25A) o Flag (Fig. 25B).



Figura 25. Identificazione del residuo di lisina coinvolto nell'ubiquitinazione di VP13/14 5'Flag. Cellule 293T sono state co-trasfettate con il costrutto codificante VP13/14 5'Flag e il costrutto codificante l'ubiquitina *wild type*, il mutante dell'ubiquitina K48R, K63R o K0, tutti fusi all'epitopo HA. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate e la proteina VP13/14 5'Flag è stata immunoprecipitata mediante un anticorpo anti-Flag. Gli immunoprecipitati risultanti sono stati separati mediante SDS-PAGE e analizzati mediante western blot utilizzando un anticorpo anti-HA (A) o anti-Flag (B). In figura 25B è stata evidenziata la presenza negli immunoprecipitati di VP13/14 5'Flag.

Come si può notare dalla figura 25A, il segnale relativo all'ubiquitinazione è risultato evidenziabile in presenza del mutante di ubiquitina incapace di polimerizzare a livello del residuo di lisina 48, ma non in presenza di quello incapace di polimerizzare a livello del residuo di lisina 63. Conseguentemente, la natura dell'ubiquitinazione di VP13/14 5'Flag è conforme a quanto atteso nel caso del direzionamento di una proteina ai MVB, ad ulteriore conferma di un possibile coinvolgimento del relativo *pathway* nel ciclo replicativo di HSV-1.

6. DISCUSSIONE

Nel corso degli ultimi anni, vari studi hanno chiaramente dimostrato il coinvolgimento del sistema endocitico-lisosomale cellulare nelle fasi finali del ciclo replicativo di numerosi virus a RNA dotati di envelope^{11, 15, 21, 56, 95}. L'apparato endocitico-lisosomale è costituito da una fitta rete di vescicole che trasportano numerosi prodotti proteici tra i vari organelli membranosi costituenti il sistema stesso, in particolar modo membrana plasmatica, trans-Golgi network (TGN) e lisosomi¹¹. L'elemento centrale in tale sistema è rappresentato dai *multivesicular* bodies (MVB), strutture di derivazione endosomiale caratterizzate dalla presenza di centinaia di vescicole interne^{3, 105} la cui formazione, nel lievito, è affidata ad un insieme di 17 proteine note come vacuolar protein sorting (Vps) di classe E, ciascuna presentante uno o più omologhi nelle cellule di mammifero⁶². Secondo il modello classico, la biogenesi dei MVB è guidata dall'assemblaggio sequenziale e transitorio delle proteine Vps in quattro diversi complessi proteici denominati ESCRT-0, I, II e III^{69, 104}, la cui dissociazione, necessaria al riciclo dell'intero meccanismo, è affidata all'azione di un'AAA ATP-asi specifica (Vps4)^{61, 82, 96}. Il sistema endocitico-lisosomale è finalizzato allo smistamento di svariate proteine cellulari provenienti dalla membrana plasmatica o dal TGN e destinate ad essere degradate nei lisosomi o riciclate alla membrana stessa^{30, 69}. L'identificazione di una proteina come substrato destinato ai lisosomi o ai proteasomi, i due principali siti di degradazione cellulare, è basata sulla sua ubiquitinazione e, in particolar modo, il residuo di lisina coinvolto nella polimerizzazione delle catene di poliubiquitina coniugate ad una proteina determina a quale dei due siti essa sia indirizzata. Nello specifico, una proteina sarà inviata ai lisosmi, via MVB, o ai proteasomi, a seconda che il residuo di lisina coinvolto sia il 63 o il 48, rispettivamente^{37, 45, 69}.

Come già accennato, diversi virus a RNA dotati di *envelope*, tra cui retrovirus, rabdovirus, filovirus, arenavirus e, probabilmente, orto- e paramixovirus, sfruttano il *pathway* di biogenesi dei MVB per acquisire il proprio rivestimento lipidico e gemmare dalla cellula infetta^{11, 56}. I sistemi utilizzati dai virus a tal fine sono basati sulla presenza di particolari sequenze aminoacidiche note come *Late domain* (*L-domain*) all'interno delle proteine strutturali virali e/o sulla loro ubiquitinazione⁵⁶. Per definizione un *L-domain* è una sequenza aminoacidica ricca in prolina

riconosciuta come sito di legame dalle proteine coinvolte nel pathway dei MVB. Sono state individuate almeno tre classi principali di *L-domain*, ciascuna correlata a specifici *partner* cellulari: P(T/S)AP, YPxL e PPxY, associate, rispettivamente, alle proteine Tsg101 (ESCRT-I), AIP1 (proteina d'interconnessione tra ESCRT-I ed ESCRT-III) e alle ubiquitino-ligasi Nedd4^{6, 56}. E' stato dimostrato che, nell'economia virale, ciascuna di tali sequenze risulta essenziale per garantire un'elevata efficienza nel rilascio di particelle infettive, tant'è vero che l'abolizione della funzionalità dei motivi in questione causa l'inibizione della gemmazione virale^{6, 30, 51, 95}. I vari Ldomain possono agire in modo sinergico e complementare ed infatti è piuttosto frequente che più motivi di questo tipo si trovino contemporaneamente all'interno della medesima proteina strutturale, fino a giungere al caso limite della proteina VP40 del virus Ebola che, addirittura, presenta due *L-domain* sovrapposti⁵⁶. Una stessa proteina può essere coinvolta direttamente nel pathway dei MVB, mediante interazione fisica con una delle proteine che ne fanno parte, reclutate dai domini P(T/S)AP e YPxL, oppure indirettamente, in seguito alla sua ubiquitinazione ad opera dei membri della famiglia delle ubiquitino-ligasi Nedd4 reclutati dal dominio PPxY. L'ubiquitinazione costituisce un aspetto fondamentale nel meccanismo di biogenesi dei MVB, tant'è vero che molte delle proteine componenti i complessi ESCRT presentano domini in grado di riconoscere l'ubiquitina e, molto spesso, risultano ubiquitinate esse stesse¹⁰⁴. Anche diverse proteine virali esibiscono vari livelli di ubiquitinazione, ma non è ancora chiaro se tale modifica sia funzionale all'introduzione della proteina stessa nella particella virale o se, piuttosto, rappresenti un effetto secondario dovuto alla presenza ingente di tale molecola nel pathway utilizzato dai virus per gemmare dalla cellula infetta³⁰. Ciononostante, studi presenti in letteratura hanno dimostrato che la deplezione dell'ubiquitina libera causa l'arresto della gemmazione virale, anche se, nuovamente, non è chiaro se tale effetto sia dovuto ad una mancata ubiquitinazione delle proteine virali o di quelle cellulari implicate nella biogenesi dei MVB³⁰.

Decisamente più limitate sono le conoscenze relative alle fasi finali di assemblaggio, acquisizione dell'*envelope* e gemmazione dei virus a DNA dotati di *envelope*. Tuttavia, anche per questa categoria di virus, negli ultimi anni è stato proposto un coinvolgimento del *pathway* dei MVB analogamente a quanto appena descritto per i corrispondenti virus a RNA¹⁵. La maggior parte delle ricerche in quest'ambito sembra essersi concentrata principalmente su una specifica famiglia, quella degli

Herpesviridae, e, in particolar modo, su uno dei suoi rappresentanti più noti: l'herpes simplex virus di tipo 1 (HSV-1).

I modelli più recenti rappresentano il ciclo replicativo di HSV-1 come una serie di passaggi successivi caratterizzati da due distinti eventi di fusione e di gemmazione⁵⁴. Una volta che il virus si è legato alla superficie cellulare mediante l'interazione con opportuni recettori^{31, 92}, il capside rilasciato nel citoplasma viene trasportato al nucleo lungo i microtubuli^{42, 54, 90}. Durante questo percorso anterogrado, alcune proteine del tegumento vengono liberate nel citoplasma, mentre altre, funzionali al rilascio del DNA virale nel nucleo, rimangono associate al capside⁴². In seguito al contatto tra il capside e la membrana nucleare, il DNA virale penetra nel nucleo dove hanno inizio sia la trascrizione che la replicazione del genoma. La fuoriuscita dal nucleo implica, in successione, l'acquisizione di un primo *envelope*, a livello della membrana nucleare interna, e la sua perdita, a livello di quella esterna⁵⁴. Nel citoplasma, le proteine costituenti il tegumento si associano da un lato alle proteine del capside, dall'altro alle glicoproteine presenti sulle membrane del TGN^{55, 97}. Si vengono così a formare due "sottocomplessi" distinti la cui associazione porta al completamento della struttura proteica della particella⁵⁵. La sede dell'assemblaggio definitivo e dell'acquisizione dell'envelope, così come il processo di gemmazione, sono a carico di un organello membranoso potenzialmente associabile all'apparato di Golgi, al trans-Golgi network o ai MVB¹⁰, ma non ancora universalmente identificato.

Lo scopo del presente lavoro, dunque, è quello di contribuire a chiarire quale sia la base cellulare coinvolta nelle fasi finali del ciclo replicativo di HSV-1, focalizzando l'attenzione principalmente sui MVB. Studi recenti hanno dimostrato non solo che la capacità di acquisire l'*envelope* da parte di tale virus è strettamente dipendente dalla corretta funzionalità del meccanismo di biogenesi dei MVB, ma che anche il *trafficking* intracellulare e la maturazione di gB, glicoproteina essenziale di HSV-1, dipendono dall'efficienza del medesimo *pathway*^{10, 19}. Note quindi sia la localizzazione di gB ai MVB che la fitta rete di interazioni proteiche reciproche che guidano la formazione del virione, si è deciso di verificare se anche le proteine del tegumento fossero correlate ai MVB così da indicare tale compartimento come il sito di aggregazione definitivo della particella virale.

Innanzitutto, si è proceduto, quindi, all'analisi bioinformatica di tali proteine allo scopo di individuare la presenza di sequenze che potessero suggerirne un coinvolgimento nel *pathway* dei MVB. In effetti, le indagini svolte hanno evidenziato l'esistenza di motivi riconducibili a *L-domain* noti all'interno di due proteine del tegumento essenziali nel ciclo replicativo di HSV-1: VP1/2 e VP16.

VP1/2 è una proteina di grandi dimensioni facente parte del tegumento interno, dove è la principale responsabile del legame tra il tegumento stesso e il capside¹⁰⁸. Tale proteina presenta numerosi ruoli funzionali fondamentali in più fasi della replicazione virale, quali, ad esempio, il trasporto del nucleocapside lungo i microtubuli⁸⁴, il rilascio del DNA genomico nel nucleo⁴² e la gemmazione della progenie infettiva dalla cellula infetta²². Il taglio proteolitico dell'estremità Nterminale di VP1/2, porta alla formazione di un frammento proteico con attività deubiquitinasica specifica⁴⁴. La conservazione di tale attività negli omologhi di VP1/2 all'interno dell'intera famiglia degli *Herpesviridae*⁴⁴, associato all'importanza rivestita dai processi di ubiquitinazione/deubiquitinazione nella regolazione del processo di biogenesi dei MVB¹⁰⁴, rappresenta un'ulteriore prova a favore della dipendenza del ciclo replicativo virale da tale *pathway*, per lo meno per quel che riguarda gli herpesvirus. Anche la proteina VP16 presenta molteplici ruoli strutturali e funzionali. Strutturalmente, viste le numerose interazioni in cui è coinvolta^{26, 34, 88,} ¹⁰⁷, VP16 è stata proposta come elemento di congiunzione tra i due "sottoassemblaggi" proteici che costituiscono la particella virale⁵⁵. Da un punto di vista funzionale, invece, tale proteina è la principale responsabile dell'inizio della trascrizione dei geni $\alpha^{1, 5, 78}$, così come una delle più importanti proteine dotate di funzioni regolatorie sull'attività di fattori virali fondamentali durante l'infezione quali, ad esempio, la proteina VHS^{27, 88}.

La proteina VP1/2 presenta ben cinque diversi *L-domain*, tuttavia, data la sua importanza nell'ambito della gemmazione dei virus a RNA dotati di *envelope*³⁰, abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione sul primo di tali motivi, una sequenza PSAP, nota per interagire con la proteina Tsg101. Sono stati clonati due frammenti proteici fusi all'epitopo Flag corrispondenti ai primi 533 (VP1/2₁₋₅₃₃) o ai primi 767 aminoacidi (VP1/2₁₋₇₆₇) di VP1/2 presentanti, rispettivamente, il motivo PSAP o i motivi PSAP e YPASPGL e caratterizzati dal mantenimento dell'attività deubiquitinasica e della capacità d'interagire con le altre proteine del tegumento^{44, 101}. In particolar modo, il secondo frammento è stato clonato allo scopo di valutare eventuali influenze reciproche di un dominio sull'altro. Inizialmente, si è valutata la localizzazione intracellulare dei due frammenti mediante immunocitofluorescenza indiretta. Da tali analisi è risultato evidente che solamente il frammento contenente

entrambi gli *L-domain* localizza, almeno parzialmente, a livello delle membrane dei MVB, mentre l'altro tende a rimanere confinato nel nucleo. Per quel che riguarda le forme tronche di VP1/2, quindi, la sequenza PSAP sembra non essere sufficiente per indirizzare la proteina ai MVB, mentre sembra che tale localizzazione sia dovuta al motivo YPASPGL o, quantomeno, ad un'azione sinergica di entrambi i domini presenti. Una possibile spiegazione della mancata localizzazione di VP1/2₁₋₅₃₃ ai MVB potrebbe risiedere anche nelle alterazioni conformazionali che tale proteina potrebbe presentare rispetto al *wild type* o alla forma tronca di dimensioni maggiori, alterazioni che potrebbero celare il dominio PSAP impedendone l'interazione col proprio *partner* cellulare. Studi pubblicati in letteratura, inoltre, riportano che la proteina VP1/2 sia presente a livello citoplasmatico in associazione a strutture membranose non meglio identificate. Pertanto, data la maggiore coerenza tra quanto da noi osservato per la proteina VP1/2₁₋₇₆₇ e quanto riportato in letteratura, è stato possibile supporre che tale frammento sia più rappresentativo della proteina *wild type* e che quest'ultima, a propria volta, localizzasse ai MVB.

In un secondo momento, si è deciso di verificare le interazioni tra i due *L-domain* presenti nella forma tronca che localizza ai MVB e i rispettivi *partner* cellulari: Tsg101 e AIP1. Saggi di co-immunoprecipitazione hanno evidenziato un'interazione diretta specifica di VP1/2₁₋₇₆₇ con Tsg101, ma non con AIP1. In realtà, nelle particolari condizioni sperimentali utilizzate, AIP1 immunoprecipita in maniera aspecifica, ma questo aspetto non può far escludere a priori un'interazione tra VP1/2 e tale proteina, soprattutto alla luce di quanto osservato relativamente alla localizzazione intracellulare di VP1/2₁₋₇₆₇. Nondimeno, i risultati del saggio appena descritto confermano un coinvolgimento del dominio PSAP nell'introduzione di VP1/2 nel *pathway* dei MVB, a sostegno di un'azione sinergica dei domini presenti in VP1/2₁₋₇₆₇ o di una struttura terziaria inappropriata per quel che riguarda VP1/2₁₋₅₃₃.

Successivamente si è deciso di analizzare l'azione del dominio PSAP in esame all'interno della proteina *wild type*, allo scopo di evidenziare eventuali variazioni dovute agli altri *L-domain* presenti nella proteina stessa. E' stato quindi necessario clonare la sequenza codificante VP1/2 *in frame* con la sequenza codificante l'epitopo Flag, valutarne l'efficienza d'espressione e, infine, procedere alla ripetizione dei saggi di immunocitofluorescenza indiretta e di co-immunoprecipitazione. I risultati ottenuti hanno pienamente confermato quanto osservato per la forma tronca: non solo

la proteina VP1/2 localizza, almeno parzialmente, a livello delle membrane dei MVB, ma interagisce anche in modo diretto e specifico con Tsg101. Data la presenza di due domini di tipo YPxL e di due domini di tipo P(T/S)AP nella proteina *full length*, è possibile supporre che l'effetto attribuito a ciascuno di essi per quel che riguarda la forma tronca venga rafforzato nella proteina *wild type*.

Per completare il quadro d'informazioni relative al dominio PSAP, infine, è stato deciso di mutagenizzare tale sequenza aminoacidica così da identificarne i residui chiave responsabili del riconoscimento/attacco da parte di Tsg101. Nell'ambito dei virus a RNA dotati di envelope è stato dimostrato che la sostituzione di uno qualunque degli aminoacidi costituenti il dominio PSAP con un'alanina causa l'abrogazione della funzione del dominio e il blocco della gemmazione virale^{30, 38}. Si è quindi deciso di mutagenizzare la proteina VP1/2₁₋₇₆₇ mediante sostituzione della prima prolina o di entrambi i primi due aminoacidi con altrettante alanine, nell'eventualità che la prima modifica non fosse sufficiente. Tuttavia, dal successivo esperimento di co-immunoprecipitazione, è risultato che nessuna delle due mutazioni è stata in grado di abolire l'interazione specifica tra $VP1/2_{1-767}$ e Tsg101. L'effetto della singola mutazione potrebbe essere strettamente dipendente dalla natura del virus in questione e/o dal particolare ambiente cellulare considerato. Ciononostante, la diversa risposta al medesimo tipo di mutazione potrebbe costituire anche una differenza interessante nell'ambito della reinterpretazione di un dominio di origine cellulare, quale il PSAP, tra virus a RNA dotati di envelope e i corrispondenti virus a DNA. Per trovare definitiva conferma alle nostre ipotesi, si valuteranno altri possibili schemi di mutagenesi che coinvolgeranno contemporaneamente i due residui di prolina, presumibilmente gli aminoacidi più rappresentativi del dominio in questione. La seconda proteina del tegumento in cui sono stati individuati degli L-domain è VP16. Analogamente a quanto descritto per VP1/2, innanzitutto si è valutata la localizzazione intracellulare del polipeptide mediante immunocitofluorescenza indiretta eseguita su cellule infettate con un virus ricombinante esprimente la proteina VP16 fusa alla proteina fluorescente GFP. Anche in questo caso, la proteina è risultata localizzare a livello delle membrane dei MVB e, dal momento che VP16 presenta un unico L-domain, PPLY, la sua localizzazione in questo sito può essere attribuita solo a tale dominio. Com'è noto, il partner cellulare dei domini di tipo PPxY è costituito dalla famiglia delle ubiquitino-ligasi Nedd4 e si è deciso, quindi, di verificare se la stessa VP16 potesse essere bersaglio di ubiquitinazione. Dopo aver

clonato il gene codificante la proteina d'interesse arricchita di opportune sequenze codificanti gli epitopi Flag o HA, così da favorirne l'identificazione, si è valutata l'ubiquitinazione di VP16 mediante un saggio di immunoprecipitazione. Dai risultati dell'esperimento è sembrato evidente che la proteina non venga ubiquitinata, perlomeno in seguito alla sola trasfezione e, quindi, in assenza di altre proteine virali. Tuttavia, essendo noto che le proteine caratterizzate dal dominio PPxY possono interagire con i membri della famiglia delle ubiquitino-ligasi Nedd4 senza essere necessariamente ubiquitinate a propria volta¹⁰, si è valutato se questo fosse anche il caso di VP16. A tal fine è stato effettuato un saggio di coimmunoprecipitazione overesprimendo, in cellule 293T, VP16 e uno dei seguenti membri delle ubiquitino-ligasi Nedd4: Nedd4-1, Nedd4-2, WWP1 e AIP4^{11, 93}. I dati ottenuti hanno permesso di escludere un'interazione diretta tra VP16 e ciascuno degli enzimi considerati. E' possibile ipotizzare che le condizioni sperimentali utilizzate non siano quelle più appropriate in questo contesto o che VP16 interagisca con membri delle ubiquitino-ligasi Nedd4 diversi da quelli considerati. Inoltre, è possibile supporre che la localizzazione di VP16 ai MVB, osservata precedentemente, sia da attribuirsi ad un'interazione indiretta della proteina con altri fattori virali non presenti in trasfezione. A sostegno di quest'ultima ipotesi vi sono anche dei dati sperimentali relativi al fatto che la localizzazione intracellulare di VP16 in seguito a trasfezione è diversa rispetto a quella da noi osservata in infezione. VP16, quindi, potrebbe essere veicolata ai MVB indirettamente mediante associazione fisica con altre proteine virali oppure, tale interazione, potrebbe implicare una variazione conformazionale della proteina stessa con conseguente esposizione del dominio PPLY. In quest'ultimo caso il direzionamento di VP16 ai MVB potrebbe essere guidato direttamente dal suo legame con le ubiquitino-ligasi o dalla sua ubiquitinazione ad opera dei medesimi enzimi. Come possibili partner d'interazione sono stati presi in considerazione alcuni prodotti proteici del cluster genico costituito da UL46, UL47, UL48 e UL49 codificanti, rispettivamente, VP11/12, VP13/14, VP16 e VP22. In particolar modo, sono state valutate le proteine VP13/14 e VP22, in quanto, dati riportati in letteratura, hanno evidenziato interazioni dirette o potenziali di VP16 con ciascuna di esse, sia da un punto di vista strutturale che funzionale^{48, 101}. Inizialmente, le sequenze codificanti ognuna delle due proteine sono state clonate in un opportuno vettore di espressione eucariotica e addizionate di una sequenza codificante l'epitopo Flag. Le interazioni fisiche di VP16 con VP13/14

e VP22, quindi, sono state analizzate mediante un saggio di coimmunoprecipitazione. I risultati ottenuti hanno confermato che l'interazione tra VP16 e VP22 è diretta e indipendente da altri fattori virali. Un simile dato trova riscontro anche in studi di co-localizzazione pubblicati in letteratura, in cui cellule infettate presentano entrambe le proteine a livello di siti specifici, quali le vescicole del TGN o compartimenti endosomiali interni al pathway di secrezione³⁶. Viceversa, nelle medesime condizioni sperimentali, non è stato possibile individuare alcun tipo di interazione tra VP16 e VP13/14. Tuttavia, questo dato non esclude una possibile associazione indiretta tra le due proteine in questione, mediata, ad esempio, da VP22, da un altro membro del cluster genico di appartenenza o da una delle glicoproteine con cui il tegumento entra in contatto.

Nel caso in cui la localizzazione di VP16 ai MVB dipenda dalla sua interazione con VP22, tale direzionamento potrebbe essere causato dalla presenza di L-domain non canonici in VP22 o dalla sua ubiquitinazione. Una simile modifica potrebbe essere potenzialmente mediata dalla stessa VP16, nell'ipotesi di una variazione conformazionale di quest'ultima dovuta all'interazione con VP22 e tale da permetterne l'interazione con le ubiquitino-ligasi Nedd4. Al fine di verificare se VP22 sia ubiquitinata e se tale modifica post-traduzionale sia legata alla presenza di VP16, si è proceduto ad un saggio di immunoprecipitazione. Ne è risultato che VP22 è effettivamente ubiquitinata e che tale fenomeno non dipende in alcun modo da VP16, che, nuovamente, non risulta essere coniugata a propria volta all'ubiquitina. I dati ottenuti suggeriscono due possibili conclusioni. Primo, l'ubiquitinazione di VP22 potrebbe essere dovuta alla presenza di *L-domain* non canonici tali da reclutare direttamente opportune ubiquitino-ligasi a livello della proteina virale in questione. Secondo, anche nel caso in cui VP16 presentasse una struttura tridimensionale non idonea all'interazione con i membri delle ubiquitino-ligasi Nedd4, comunque l'interazione con VP22 non comporta una variazione conformazionale tale da modificare questa condizione. Se così fosse, infatti, il saggio eseguito avrebbe rilevato variazioni nel livello di ubiquitinazione di VP22 in presenza di VP16. Sembra dunque che l'interazione con VP22 non rappresenti la chiave di lettura per comprendere i meccanismi alla base della localizzazione di VP16 a livello delle membrane dei MVB. Per fugare ogni dubbio, sarebbe necessario eseguire lo stesso tipo di esperimenti descritti anche in condizioni di overespressione dei vari membri delle ubiquitino-ligasi Nedd4, così da verificare un eventuale aumento nell'ubiquitinazione delle proteine del tegumento, dovuto agli enzimi in questione, o una possibile interazione fisica tra VP16 e i medesimi enzimi, in presenza delle proteine tegumentarie fin qui considerate. Infine, vi è la possibilità che la localizzazione di VP16 ai MVB non sia da attribuirsi ad una sua associazione con qualche proteina del tegumento, quanto piuttosto con la glicoproteina gB, *partner* d'interazione di VP16 nonché bersaglio delle ubiquitino-ligasi Nedd4^{10, 109}.

Dato che VP22 risulta ubiquitinata e che tale modifica post-traduzionale, apparentemente, è indipendente dalla sua interazione con VP16, si è deciso di valutare se anche VP13/14, priva d'interazioni con la medesima proteina, potesse presentare lo stesso tipo di coniugazione. Mediante saggio un di immunoprecipitazione, in cui sono stati utilizzati opportuni mutanti dell'ubiquitina, si è dimostrato che VP13/14, a propria volta, è ubiquitinata e che il residuo di lisina coinvolto nella polimerizzazione delle catene di ubiquitina, K63, è quello generalmente coinvolto nei processi di indirizzamento di una proteina ai lisosomi via MVB⁴⁵. Potrebbe essere interessante analizzare la cinetica di ubiquitinazione della proteina in questione. E' noto infatti che tale modifica rappresenta il segnale di accesso alla via dei MVB/lisosomi, ma la destinazione finale potrebbe variare in base alla fase del ciclo replicativo in cui la proteina viene ubiquitinata. Infatti, nelle fasi iniziali dell'infezione, in seguito alla spoliazione del capside, l'ubiquitinazione potrebbe indirizzare la proteina alla degradazione nei lisosomi, mentre, nelle fasi finali dell'infezione, la medesima modifica post-traduzionale, potrebbe guidare la stessa proteina solo fino ai MVB, potenziale sede dell'assemblaggio definitivo della particella virale. In quest'ottica sarebbe interessante analizzare anche la natura del residuo di lisina coinvolto nell'ubiquitinazione di VP22 e la fase del ciclo replicativo in cui l'ubiquitina viene coniugata alla proteina in questione. Infine, maggiore completezza alle informazioni raccolte finora potrebbe essere fornita dall'analisi della localizzazione intracellulare delle proteine tegumentarie VP13/14 e VP22, nonché delle eventuali variazioni in tale localizzazione in assenza di ubiquitinazione. Riassumendo, almeno quattro proteine facenti parte del tegumento di HSV-1, VP1/2, VP13/14, VP16 e VP22, sembrano essere reclutate al pathway di biogenesi dei MVB. Due di esse, VP1/2 e VP16, presentano sequenze identificabili come Ldomain al proprio interno ed entrambe localizzano, almeno parzialmente, a livello delle membrane dei MVB. Nel caso di VP1/2 tale localizzazione presumibilmente è da attribuirsi ad un'azione sinergica dei domini di tipo P(T/S)AP e YPxL in essa presenti e alla loro interazione diretta con i rispettivi *partner* cellulari, di cui quella con Tsg101 è stata chiaramente dimostrata.

Nel caso di VP16, invece, il meccanismo di reclutamento sembra essere più complesso e mediato probabilmente da altri fattori virali, tant'è vero che tale proteina localizza a livello dei MVB solamente in seguito ad infezione, quando tutte le proteine erpetiche sono presenti all'interno della cellula. Due dei possibili *partner* d'interazione di VP16 riportati in letteratura, VP13/14 e VP22, sono stati analizzati al fine di verificare se essi rappresentino l'elemento necessario al reclutamento di VP16 ai MVB, ma solamente VP22 è risultata in grado d'interagire direttamente con tale proteina. Nonostante ciò VP22 non sembra corrispondere al fattore virale cercato, almeno in base ai dati raccolti finora. Tuttavia, sia VP22 che VP13/14 sono soggette ad ubiquitinazione, modifica che rappresenta la seconda strategia utilizzata dai virus per sfruttare il meccanismo di biogenesi dei MVB a proprio vantaggio. Inoltre, l'ubiquitinazione di VP13/14 è risultata del tipo specifico per l'indirizzamento di una proteina proprio ai MVB/lisosomi, anche se è ancora da chiarire quale dei due organelli rappresenti il sito di destinazione finale di tale proteina.

In conclusione, i capsidi neo-formati potrebbero essere guidati ai MVB dalla proteina VP1/2, cui risultano associati già in seguito alla gemmazione dalla membrana nucleare⁹, e, a livello di tali organelli, interagire con altre importanti proteine tra cui VP16. In seguito, la fitta rete di interazioni che sussiste tra le varie proteine strutturali potrebbe portare alla riunione dei due "sottoassemblaggi" costituenti il tegumento e, successivamente, al completamento della particella virale. In un simile contesto, quindi, le membrane dei MVB potrebbero rappresentare il sito di formazione del secondo "sottoassemblaggio" proteico, se non addirittura il sito di assemblaggio definitivo e di gemmazione del virione.

92

7. BIBLIOGRAFIA

- Advani S.J, Durand L.O, Weichselbaum R.R, Roizman B. Oct-1 is posttranslationally modified and exhibits reduced capacity to bind cognate sites at late times after infection with herpes simplex virus 1. *J Virol*, 2003, 77(22): 11927-32.
- 2. Avitabile E, Ward P, di Lazzaro C, Torrisi M, Roizman B, Campadelli-Fiume G. The herpes simplex virus UL20 protein compensates for the differential disruption of exocytosis of virions and viral membrane glycoproteins associated with fragmentation of the Golgi apparatus. *J Virol*, 1994, 68: 7397-405.
- 3. Babst M. A protein's final ESCRT. Traffic, 2005, 6: 2-9.
- Baines J.D, Weller S.K. Cleavage and packaging of herpes simplex virus 1 DNA. In: Catalano C.E. (Ed.), *Viral genome packaging machines: genetics, structures, and mechanism*, Landes biosciences, Georgetown, TX, USA. 2005.
- Batterson W, Roizman B. Characterization of the herpes simplex virus virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. J Virol, 1983, 46(2): 371-7.
- Bieniasz P.D. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology*, 2006, 344: 55-63.
- Bowzard J.B, Visalli R.J, Wilson C.B, Loomis J.S, Callhan E.M, Courtney R.J, Wills J.W. Membrane targeting properties of a herpesvirus tegument protein-retrovirus Gag chimera. *J Virol*, 2000, 74: 8692-9.

- Brignati M.J, Loomis J.S, Wills J.W, Courtney R.J. Membrane association of VP22, a herpes simplex virus type 1 tegument protein. J Virol, 2003, 77(8): 4888-98.
- Bucks M.A, O'Regan K.J, Murphy M.A, Wills J.W, Courtney R.J. Herpes simplex virus type 1 tegument proteins VP1/2 and UL37 are associated with intranuclear capsids. *Virology*, 2007, 361: 316-24.
- Calistri A, Sette P, Salata C, Cancellotti E, Forghieri C, Comin A, Göttlinger H, Campadelli-Fiume G, Palù G, Parolin C. Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J Virol*, 2007, 81(20): 11468-78.
- Calistri A, Salata C, Parolin C, Palù G. Role of multivesicular bodies and their components in the egress of enveloped RNA viruses. *Rev Med Virol*, 2008, 19(1): 31-45 [Epub ahead of print].
- 12. **Campadelli-Fiume G, Roizman B**. The egress of herpesviruses from cells: the unanswered questions. *J Virol*, 2006, 80(13): 6716-7.
- Campadelli-Fiume G, Menotti L. Entry of alphaherpesviruses into the cell. In: Arvin A, Mocarski E, Moore P.S, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K (Ed.), *Human herpesviruses*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 2007.
- Chatellard-Causse C, Blot B, Cristina N, Torch S, Missotten M, Sadoul R. Alix (ALG-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytolplasmic vacuolarization. *J Biol Chem*, 2002, 277: 29108-15.
- 15. Chen B.J, Lamb R.A. Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology*, 2008, 372: 221-32.

- 16. Chi J.H, Harley C.A, Mukhopadhyay A, Wilson D.W. The cytoplasmic tail of herpes simplex virus envelope glycoprotein D binds to the tegument protein VP22 and to capsids. *J Gen Virol*, 2005, 86(2): 253-61.
- Coen D.M, Schaffer P.A. Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets. *Nat Rev Drug Disc*, 2003, 2(4): 278-88.
- Crump M.C, Bruun B, Bell S, Pomeranz L.E, Minson T, Browne H.M. Alphaherpesvirus glycoprotein M causes the relocalization of plasma membrane proteins. *J Gen Virol*, 2004, 85: 3517-27.
- Crump M.C, Yates C, Minson T. Herpes simplex virus type-1 cytoplasmiv envelopment requires functional Vps4. J Virol, 2007, 81: 7380-7.
- Davidson A.J, Wilkie N.M. Nucleotide sequences of the joint between the L and S fragments of herpes simplex virus types 1 and 2. *J Gen Virol*, 1981, 55(Pt2): 315-31.
- Demirov D.G, Freed E.O. Retrovirus budding. *Virus Res*, 2004, 106: 87-102.
- 22. **Desai J.P**. A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *J Virol*, 2000, 74(24): 11608-18.
- 23. Desai J.P, Sexton G.L, Huang E, Person S. Localization of herpes simplex virus type 1 UL37 in the Golgi complex requires UL36 but not capsid structures. *J Virol*, 2008, 82(22): 11354-61.
- 24. **Donnelly M, Elliott G**. Nuclear localization and shuttling of herpes simplex virus tegument protein VP13/14. *J Virol*, 2001, 75: 2566-74.

- 25. Duffy C, La Vail J.H, Tauscher A.N, Wills E.G, Blaho J.A, Baines J.D. Characterization of a UL49-null mutant: VP22 of herpes simplex virus type 1 facilitates viral spread in cultured cells and the mouse cornea. *J Virol*, 2006, 80: 8664-75.
- 26. Elliott G, Mouzakitis G, O'Hare P. VP16 interacts via its activation domain with VP22, a tegument protein of herpes simplex virus, and is relocated to a novel macromolecular assembly in coexpressing cells. J Virol, 1995, 69: 7932-41.
- 27. Everly D.N. Jr, Feng P, Mian I.S, Read G.S. mRNA degradation by the virion host shutoff (Vhs) protein of herpes simplex virus: genetic and biochemical evidence that Vhs is a nuclease. *J Virol*, 2002, 76(16): 8560-71.
- 28. Farnsworth A, Wisner T.W, Johnson D.C. Cytoplasmic residues of herpes simplex virus glycoprotein gE required for secondary envelopment and binding of tegument proteins VP22 and UL11 to gE and gD. J Virol, 2007, 81(1): 319-31.
- 29. Foster T.P, Alvarez X, Kousoulas K.G. Plasma membrane topology of syncytial domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K (gK): the UL20 protein enables cell surface localization of gK but not gK-mediated cell-cell fusion. *J Virol*, 2003, 77: 499-510.
- 30. Garrus J.E, von Schwedler U.K, Pornillos O.W, Morham S.G, Zavitz K.H, Wang H.E, Wettstein D.A, Stray K.M, Côté M, Rich R.L, Myszka D.G, Sundquist W.I. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, 2001, 107: 55-65.
- 31. Gianni T, Forghieri C, Campadelli-Fiume G. The herpesvirus glycoproteins B and H.L are sequentially recruited to the receptor-bound gD to effect membrane fusion at virus entry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(39):14572-7.

- 32. Göttlinger H.G, Dorfman T, Sodroski J.G, Haseltine W.A. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *PNAS USA*, 1991, 88: 3195-99.
- 33. Granzow H, Klupp B.G, Fuchs W, Veits J, Osterreider N, Mettenleiter T.C. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. J Virol, 2001, 75: 3675-84.
- 34. Gross S, Harley C, Wilson D.W. The cytoplasmatic tail of herpes simplex virus glycoprotein H binds to the tegument protein VP16 in vitro and in vivo. *Virology*, 2003, 317: 1-12.
- 35. Gruenberg J, Stenmark H. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5: 317-23.
- 36. Hafezi W, Bernard E, Cook R, Elliott G. Herpes simplex virus tegument protein VP22 contains an internal VP16 interaction domain and a Cterminal domain that are both required for VP22 assembly into the virus particle. *J Virol*, 2005, 79(20): 13082-93.
- 37. Hicke L, Dunn R. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, 19: 141-72.
- 38. Huang M, Orenstein J.M, Martin M.A, Freed E.O. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol*, 1995, 69: 6810-8.
- Hurley J.H, Emr S.D. The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2006, 35: 277-98.
- 40. **Hurley J.H**. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20: 4-11.

- 41. Jayachandra S, Baghian A, Kousoulas K.G. Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K is not essential for infectious virus production in actively replicating cells but is required for efficient envelopment and translocation of infectious virions from the cytoplasm to the extracellular space. *J Virol*, 1997, 71(7): 5012-24.
- 42. Jovasevic V, Liang L, Roizman B. Proteolytic cleavage of VP1-2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus. *J Virol*, 2008, 82(7): 3311-19.
- 43. Jura N, Scotto-Lavino E, Sobczyk A, Bar-Sagi D. Differential modification of Ras proteins by ubiquitination. *Mol Cell*, 2006, 21: 679-87.
- 44. Kattenhorn L.M, Korbel G. A, Kessler B.M, Spooner E, Ploegh H.L. A deubiquitinating enzyme encoded by HSV-1 belongs to a family of cysteine proteases that is conserved across the family *Herpesviridae*. *Mol Cell*, 2005, 19: 547-57.
- 45. Katzmann D.J, Odorizzi G, Emr S. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 893-905.
- 46. Kostelansky M.S, Schluter C, Tam Y.Y.C, Lee S, Ghirlando R, Beach B, Conibear E, Hurley J.H. Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer. *Cell*, 2007, 129: 485-98.
- 47. La Boissière S, Izeta A, Malcomber S, O'Hare P. Compartmentalization of VP16 in cells infected with recombinant herpes simplex virus expressing VP16-green fluorescent protein fusion proteins. *J Virol*, 2004, 78(15): 8002-14.
- 48. Lee J.H, Vittone V, Diefenbach E, Cunningham A.L, Diefenbach R.J. Identification of structural protein-protein interaction of herpes simplex virus type 1. *Virology*, 2008, 378: 347-54.

- 49. Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen J, Staub A, Garnier J, Mader S, Chambon P. Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell*, 1992, 68: 377-95.
- 50. Lopez M.R, Schlegel E.F, Wintersteller S, Blaho J.A. The major tegument structural protein VP22 targets areas of dispersed nucleolin and marginalized chromatin during productive herpes simplex virus 1 infection. *Virus Res*, 2008, 136: 175-88.
- 51. Martin-Serrano J, Eastman S.W, Chung W, Bieniasz P.D. HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol*, 2005, 168(1): 89-101.
- 52. Meredith D.M, Lindsay J.A, Halliburton I.W, Whittaker G.R. Posttranslational modification of the tegument proteins (VP13 and VP14) of herpes simplex virus type 1 by glycosylation and phosphorylation. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2771-5.
- 53. Mettenleiter T.C. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol*, 2002, 76 (4): 1537-47.
- 54. Mettenleiter T.C. Intriguing interplay between viral proteins during herpesvirus assembly or: The herpesvirus assembly puzzle. *Vet Mic*, 2006, 113: 163-9.
- 55. Mettenleiter T.C, Klupp B.G, Granzow H. Herpesvirus assembly: a tale of two membranes. *Curr Opin Microbiol*, 2006, 9(4): 423-9.
- 56. Morita E, Sundquist W.I. Retrovirus budding. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20: 395-425.

- 57. Morrison E.E, wang Y.F, Meredith D.M. Phosphorylation of structural components promotes dissociation of the herpes simplex virus type 1 tegument. *J Virol*, 1998, 72(9): 7108-14.
- 58. Mossman K, Sherburne R, Lavery C, Duncan J, Smiley J. Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *J Virol*, 2000, 74: 6287-99.
- 59. Murphy M.A, Bucks M.A, O'Regan K.J, Courtney R.J. The HSV-1 tegument protein pUL46 associates with cellular membranes and viral capsids. *Virology*, 2008, 376: 279-89.
- Naldinho-Souto R, Browne H, Minson T. Herpes simplex virus tegument protein VP16 is a component of primary enveloped virions. *J Virol*, 2006, 80: 2582-84.
- 61. Nickerson D.P, West M, Odorizzi G. Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes. *J Cell Biol*, 2006, 175: 715-20.
- Nickerson D.P, Russell M.R.G, Odorizzi G. A concentric model of multivesicular body cargo sorting. *EMBO J*, 2007, 8(7): 644-50.
- 63. Ojala P.M, Sodeik B, Ebersold M.W, Kutay U, Helenius A. Herpes simplex virus type 1 entry into host cell: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 4922-31.
- 64. Overton H.A, McMillan D.J, Klavinskis S, Hope L, Ritchie A.J, Wongkai-in P. Herpes simplex virus type 1 gene UL13 encodes a phosphoprotein that is a component of the virion. *Virology*, 1992, 190: 184-92.
- 65. Parent L.J, Bennett R.P, Craven R.C, Nelle T.D, Krishna N.K, Bowzard J.B, Wilson C.B, Puffer B.A, Monteraso R.C, Wills J.W. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the

Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J Virol*, 1995, 69: 5455-60.

- 66. **Park R, Baines J.D.** Herpes simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. *J Virol*, 2006, 80: 494-504.
- 67. **Patnaik A, Chau V, Wills J.W**. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *PNAS USA*, 2000, 97: 13069-74.
- 68. Pineda-Molina E, Belrhali H, Piefer A.J, Akula I, Bates P, Weissenhorn W. The crystal structure of the C-terminal domain of Vps28 reveals a conserved surface required for Vps20 recruitment. *Traffic*, 2006, 7: 1007-16.
- 69. Piper R.C, Katzmann D. Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 519-47.
- 70. Reynolds A.E, Wills E.G, Roller R.J, Ryckman B.J, Baines J.D. Ultrastructural localization of the herpes simplex virus type 1 UL31, UL34 and US3 proteins suggests specific roles in primary envelopment and egress of nucleocapsids. *J Virol*, 2002, 76: 8939-52.
- 71. Reynolds A.E, Liang L, Baines J.D. Conformational changes in the nuclear lamina induced by herpes simplex virus type 1 require genes UL31 and UL34. *J Virol*, 2004, 78: 5564-75.
- 72. Roberts A.P.E, Abaitua F, O'Hare P, McNab D, Rixon F.J, Pasdeloup D. Differing roles of inner tegument proteins pUL36 and pUL37 during entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1). *J Virol*, 2008, Oct 29 [Epub ahead of print].
- 73. Roizman B, Carmichael L.E, Deinhardt F, de-The G, Nahmias A.J, Plowright W, Rapp F, Sheldrick P, Takahashi M, Wolf K.

Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The Herpesvirus Study Group, The International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology*, 1981, 16: 201-17.

- 74. Roizman B, Sears A.E. An inquiry into the mechanisms of herpes simplex virus latency. *Annu Rev Microbiol*, 1987, 41: 543-71.
- 75. Roizman B, Sears A.E. Herpes simplex virus and their replication. In: Fields B.N, Knipe D.M, Howley P.M, et al., eds. Fields Virology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, pp. 2231-95.
- 76. Roizman B, Pellett P.E. The family *Herpesviridae*: a brief introduction. In: Fields B.N, Knipe D.M, Howley P.M, *et al.*, eds. *Fields Virology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2001, pp. 1929-39
- 77. **Roller R.J, Roizman B**. The herpes simplex virus 1 RNA binding protein UL11 is a virion component and associates with ribosomal 60S subunits. *J Virol*, 1992, 66: 3624-32.
- 78. Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, 1988, 335(6190): 563-4.
- 79. Salomon B.C, Cunningham C, Davison A.J, Harris W.J, Baines J.D. The herpes simplex virus type 1 UL17 gene encodes virion tegument proteins that are required for cleavage and packaging of viral DNA. *J Virol*, 1998, 72: 3779-88.
- 80. Sambrook J, Frieske J.F, Maniatis T. Extraction and purification of plasmid. In: Molecular cloning: a laboratory manual. *Second edition, Cold Spring Harbor, Laboratory Press,* 1989, Vol.I, section 1.25-1.33.
- 81. Schmitt A.P, Leser G.P, Morita E, Sundquist W.I, Lamb R.A. Evidence for a new viral late-domain core sequence, FPIV, necessary for budding of a paramyxovirus. *J Virol*, 2005, 79(5): 2988-97.

- 82. Scott A, Chung H.Y, Gonciarz-Swiatek M, Hill G.C, Whitby F.G, Gaspar J, Holton J.M, Viswanathan R, Ghaffarian S, Hill C.P, Sundquist W.I. Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *EMBO J*, 2005, 24: 3658-69.
- 83. Sears A.E, Roizman B. Amplification by host cell factors of sequence contained within the herpes simplex virus type 1 genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 9441-44.
- 84. Shanda S.K, Wilson D.W. UL36p is required for efficient transport of membrane-associated herpes simplex virus type 1 along microtubules. J Virol, 2008, 82(15): 7388-94.
- 85. **Shenk T**. Might a vanguard of mRNA prepare cells for the arrival of herpes simplex virus? *PNAS*, 2002, 99: 8465-6.
- 86. Shieh M.T, WuDunn D, Montgomery R.I, Esko J.D, Spear P.G. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol*, 1992, 116: 1273-81.
- 87. Simpson-Holley M, Colgrove R.C, Nalepa G, Harper J.W, Knipe D.M. Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection. *J Virol*, 2005, 79: 12840-51.
- 88. Smibert C.A, Popova B, Xiao P, Capone J.P, Smiley J.R. Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *J Virol*, 1994, 68: 2339-46.
- 89. Smith L.M, Sanders J.Z, Kaiser R.J, Hughes P, Dodd C, Connell C.R, Heiner C, Kent S.B, Hood L.E. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 1986, 321: 674-9.

- 90. Sodeik B, Ebersold M.W, Helenius A. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol*, 1997, 136: 1007-21.
- 91. Spear P.G, Roizman B. Protein specified by herpes simplex virus. V. Purification and structural proteins of the herpesvirion. *J Virol*, 1972, 9: 143-59.
- 92. Spear P.G, Eisenberg R.J, Cohen G.H. Three classes of cell surface receptors for Alphaherpesvirus entry. *Virology*, 2000, 275: 1-8.
- 93. Strack B, Calistri A, Accola M.A, Palù G, Göttlinger H.G. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *PNAS USA*, 2000, 97: 13063-8.
- 94. Strack B, Calistri A, Göttlinger H.G. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J Virol*, 2002, 77: 10700-5.
- 95. Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger H.G. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, 2003, 114: 689-99.
- 96. Stuchell-Brereton M, Skalicky J, Kieffer C, Karren M.A, Ghaffarian S, Sundquist W.I. ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature*, 2007, 449: 735-9.
- 97. Sugimoto K, Uema M, Sagara H, Tanaka M, Sata T, Hashimoto Y, Kawaguchi Y. Simultaneous tracking of capsid, tegument, and envelope protein localization in living cells infected with triply fluorescent herpes simplex virus 1. *J Virol*, 2008, 82(11): 5198-211.
- 98. Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokota K, Arai K, Yoshida M, Arai N. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA

expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukaemia virus type 1 long terminal repeat. *Mol Cell Biol*, 1988, 8(1): 466-72.

- 99. Trus B.L, Newcomb W.W, Cheng N.Q, Cardone G, Marekov L, Horna F.L, Brown J.C, Steven A.C. Allosteric signalling and a nuclear exit strategy: binding of UL25/UL17 heterodimers to DNA-filled HSV-1 capsids. *Mol Cell*, 2007, 26: 479-89.
- 100.**Turcotte S, Letellier J, Lippé R**. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol*, 2005, 79: 8847-60.
- 101.Vittone V, Diefenbach E, Triffett D, Douglas M.W, Cunningham A.L, Diefenbach R.J. Determination of interactions between tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, 2005, 79(15): 9566-71.
- 102. Ward P.L, Roizman B. Herpes simplex genes: The blueprint of a successful human pathogen. *Trends Genet*, 1994, 10: 267-74.
- 103.Weinheimer S.P, Boyd B.A, Durham S.K, Resnick J.L, O'Boyle D.R.
 2nd. Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1. *J Virol*, 1992, 66(1): 258-69.
- 104. Williams R.L, Urbé S. The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 355-68.
- 105.Winter V, Hauser M. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(3): 115-23.
- 106.**WuDunn D, Spear P.G**. Initial interaction of herpes simplex virus with cells in binding to heparan sulfate. *J Virol*, 1989, 63:52-8.

- 107.**Zhang Y, Sirko D.A, McKnight J.L.C**. Role of herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 in αTIF-mediated transcriptional induction: characterization of three viral deletion mutants. *J Virol*, 1991, 65: 829-41.
- 108.Zhou Z.H, Chen D.H, Jakana J, Rixon F.J, Chiu W. Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *J Virol*, 1999, 73(4): 3210-18.
- 109.Zhu Q, Courtney R.J. Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology*, 1994, 204(2): 590-9.
8. ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

Ab	dall'inglese: antibody
AIP1	dall'inglese: ALG-2 Interacting Protein 1
Ala	Alanina
BSA	dall'inglese: Bovine Serum Albumins
Co-IP	Co-Immunoprecipitazione
ddNTP	DiDeossiNucleotidi TriFosfato
DMEM	dall'inglese: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Acido DeossiriboNucleico
ESCRT	dall'inglese: Endosomal Sorting Complex Required for
	Transport
FBS	dall'inglese: Fetal Bovine Serum
FPIV	Fenilalanina - Prolina - Isoleucina - Valina
GFP	dall'inglese: Green Fluorescent Protein
HA	Emoagglutinina
HIV-1	Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1
HSV-1	Herpes Simplex Virus di tipo 1
ICP	dall'inglese: Infected Cell Polipeptide
IgG	Immunoglobulina G
IP	ImmunoPrecipitazione
K48	Lisina in posizione 48
K63	Lisina in posizione 63
kDa	Chilo-Dalton
LAMP	dall'inglese: Lysosomal-Associated Membrane Protein
LB	Luria-Bertani
LB	dall'inglese: Loading Buffer
L-domain	dall'inglese: Late domain
Leu	Leucina
m.o.i.	dall'inglese: Multiplicity Of Infection
mRNA	RNA messaggero
MVB	dall'inglese: MultiVesicular Bodies
Pb	Paia di basi
PBS	Tampone fosfato

PCR	Reazione a Catena della Polimerasi
PFU	dall'inglese: Plaque Forming Units
Phe	Fenilalanina
PPLY	Prolina - Prolina - Leucina - Tirosina
PPxY	Prolina - Prolina - aminoacido casuale - Tirosina
Pro	Prolina
P(T/S)AP	Prolina - (Treonina/Serina) - Alanina - Prolina
p/v	Peso/Volume
RNA	Acido RiboNucleico
Rpm	Rivoluzioni Per Minuto
SDS	Sodio Dodecil Solfato
Ser	Serina
SV40	Virus vacuolante della scimmia
TGN	Trans-Golgi Network
Thr	Treonina
Tsg101	Tumor Susceptibility Gene 101
Tyr	Tirosina
U	Unità
Ub	Ubiquitina
UL	Sequenza unica del frammento genico Long
US	Sequenza unica del frammento genico Short
VHS	Virion Host Shutoff
VP	Virion Protein
Vps	Vacuolar Protein Sorting
v/v	Volume/Volume
WB	Western Blot
YPASPGL	Tirosina - Prolina - Alanina - Serina - Prolina - Glicina -
	Leucina
YPxL	Tirosina- Prolina - aminoacido casuale - Leucina

9. RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto vorrei esprimere la mia riconoscenza al Prof. Palù per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro di tesi di dottorato presso il Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche.

Desidero inoltre ringraziare la Prof.ssa Parolin per l'interessamento e la disponibilità che ha sempre dimostrato nei miei confronti.

Un grazie speciale alla Dott.ssa Calistri per avermi permesso di collaborare con lei al suo bellissimo progetto di ricerca e per la costante fiducia dimostratami anche nei momenti in cui gli ostacoli sembravano difficili da superare.

Grazie ancora al Dott. Salata per essere stato sempre presente e per il continuo appoggio.

Grazie di cuore alla Dott.ssa Sette, per la sua infinita pazienza nei miei confronti e per essere stata un punto di riferimento sicuro e costante.

Grazie ovviamente a tutte le persone che hanno lavorato fianco a fianco con me durante questi anni per l'aiuto, il sostegno e l'allegria con cui hanno saputo arricchire ogni giornata trascorsa insieme.

Ed infine il ringraziamento più importante va alla mia famiglia che mi ha permesso di continuare a fare quello che amo e a tutti i miei amici che, seppur estranei a questo mondo, sono una presenza fondamentale e un grande aiuto.

Grazie a tutti voi.

10. PUBBLICAZIONI ALLEGATE

Intracellular trafficking and maturation of Herpes simplex virus type 1 gB and virino egress erquire functional biogenesis of multivesicular bodies. Calistri A, Sette P, Salata C, Cancellotti E, Forghieri C, <u>Comin A</u>, Göttlinger H, Campadelli-Fiume G, Palù G, Parolin C. *J Virol*, 2007, 81(20): 11468-78.

Intracellular Trafficking and Maturation of Herpes Simplex Virus Type 1 gB and Virus Egress Require Functional Biogenesis of Multivesicular Bodies⁷

Arianna Calistri,¹* Paola Sette,¹ Cristiano Salata,¹ Enrico Cancellotti,¹ Cristina Forghieri,² Alessandra Comin,¹ Heinrich Göttlinger,³ Gabriella Campadelli-Fiume,² Giorgio Palù,¹ and Cristina Parolin⁴*

Department of Histology, Microbiology, and Medical Biotechnologies, Section of Microbiology and Virology, University of Padua, Packas, Italy³; Department of Experimental Pathology, Section of Microbiology and Virology, University of Bologna, Bologna, Italy²; Program in Gene Function and Expression, Program in Molecular Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusettt²; and Department of Biology,

University of Padue, Padue, hely⁴

Received 22 June 2007/Accepted 2 August 2007

The biogenesis of multivesicular bodies (MVBs) is topologically equivalent to virion budding. Hence, a number of viruses exploit the MVB pathway to build their envelope and exit from the cell. By expression of dominant negative forms of Vps4 and Vps24, two components of the MVB pathway, we observed an impairment in infectious herpes simplex virus (HSV) assembly/egress, in agreement with a recent report showing the involvement in HSV envelopment of Vps4, the MVB-specific ATPase (C. M. Crump, C. Yates, and T. Minson, J. Virol. 81:7380–7387). Furthermore, HSV infection resulted in norphological changes to MVBs. Glycoprotein B (gB), one of the most highly conserved glycoproteins across the Herpesviridae family, was sorted to MVB membranes. In cells expressing the dominant negative form of Vps4, the site of intracellular gB accumulation was altered; part of gB accumulated as an endoglycosidase H-sensitive immature form at a calreticulin-positive compartment, indicating that gB traffic was dependent on a functional MVB pathway, gB was ubiquitinated in both infected and transfected cells. Ubiquitination was in part dependent on ubiquitin lysine 63, a signal for cargo sorting to MVBs. Partial deletion of the gB cytoplasmic tail resulted in a dramatic reduction of ubiquitination, as well as of progeny virus assembly and release to the extracellular compartment. Thus, HSV envelopment/egress and gB intracellular trafficking are dependent on functional MVB biogenesis. Our data support the view that the sorting of gB to MVB membranes may represent a critical step in HSV envelopment and egress and that modified MVB membranes constitute a platform for HSV cytoplasmic envelopment or that MVB components are recruited to the site(s) of envelopment.

Multivesicular bodies (MVBs) constitute a central station in the endocytic-hysosomal pathway. They are responsible for the biosynthetic delivery of hydrolases to lysosomes as well as for the sorting of a number of cell surface receptors, destined to degradation in the lysosome (69). At the ultrastructural level, early endosomes appear predominantly as tubulovesicular structures, whereas late endosomes, which are capable of fosing with lysosomes, exhibit a multivesicular aspect and, for this reason, are named MVBs. The transition between these two endosomal compariments occurs by involution of the limiting membrane to form intraluminal vesicles. When the MVBs fore with lysosomes, the intraluminal vesicles and their contents are degraded. Both the lipid and protein compositions of the endosome change along the pathway to lysosomes (75). A major signal for sorting of cargoes along the MVB pathway is ubiqutination (41). In Saccharomyces carevisiae, MVB biogenesis requires a total of 17 yeast class E Vps proteins (47). Vps23 and two other class E Vps proteins form a cytosolic complex termed ESCRT I (endosomal sorting complex required for transport I), which recognizes obiquitinated endosomal cargo-(41). ESCRT-I activates another soluble class E Vps complex called ESCRT-II, which in turn is required to initiate the assembly of the ESCRT-III complex on endosomal membranes (3). ESCRT-III, the core of the apparatus that drives membrane curvature and MVB vesicle formation, is formed by four structurally related class E Vps proteins that exhibit homology to human chromatin modifying proteins (CHMP) (3). Finally, to enable the recycling of MVB machinery, ESCRT-III recruits the AAA-type ATPase Vps4, a class E Vps protein that disassembles and thereby recycles the ESCRT machinery (3). Overexpression of ATPase-defective Vps4 proteins induces the formation of enlarged endosomes and dysfunctional MVBs that are defective in the sorting and recycling of endocytosed substrates ("class E" phenotypes) (3). The Vps4 mutants also prevent normal ESCRT protein trafficking, because these proteins are trapped on the surfaces of the aberrant MVBs (3). On the other hand, dominant negative forms of the ESCRT III component Vps24/CHMP3, essential for veside invagination (47), like Vps24 fused to a bulky tag such as redfluorescent protein, induce class E like phenotypes (81).

Numerous enveloped RNA viruses, including retroviruses (81, 29), rhabdoviruses (36, 45), filoviruses (35, 37, 44), arena-

^{*} Corresponding author. Mailing address: Department of Histology, Microbiology and Medical Biotechnologies, via Gabeili 63, 35121 Padova, Judy. Phone: 39-049-8272365. Fax: 39-049-8272355. E-mail for Arianna Calism: arianna.calism@unipdit. E-mail for Cristina Parolin: cristina.parolin@unipdit.

[&]quot;Published ahead of print on 8 August 2007.

viruses (83), and possibly ortho- and paramyzoviruses (82), hijack the endocytic pathway in particular membranes of MVBs as platforms for the assembly of the vision envelope and for virus egress. Essentially, two mechanisms for the recruiting, of vision proteins to the MVB pathway were highlighted. One is based on the interaction of ESCRT components with structural proteins carrying specific amino acidic motifs named late domains (L-domains), which serve as binding sites for MVB components, escort the virion proteins to the MVB membranes, and enable envelope formation and virus budding (18, 58). The other mechanism involves the ubiquitination of vision components. Different riboviruses hijack different MVB proteins and thus enter the MVB assembly pathway at different steps (18, 35, 58). The best known example is that seen with retroviruses. Gag proteins typically carry L domains with one of the tetrapeptide sequences FTAP, PPxY, and YPDL (58). In human immunodeficiency virus, the L-domain located in the p6 protein is able to recruit TSG101, the mammalian homolog of the yeast ESCRT-I component Vps23 (29, 49). The simple recruitment of the ESCRT machinery by p6 is sufficient to induce membrane curvature and fission and to drive the formation and release of virus like particles, even in the absence of viral components other than Gag (29). Viral L domains are critical also for exploiting the MVB-linked ubiquitination machinery. Evidence is particularly compelling in the case of retroviruses, which incorporate ubiquitin molecules, some of which are individually linked to Gag (50, 60-62, 72, 80). The recruitment of objquitin ligase activity by L-domains correlates with virus release (7, 38, 48, 79, 85). In addition, TSG101 is an obiquitin-binding protein (70, 71). A proteasome inhibit or that decreases the levels of free ubiquitin in the cytoplasm blocks the release of certain retroviruses (61-64, 74, 79).

Relative to riboviruses, much less is known about how DNAenveloped viruses, including herpesviruses, acquire their envelope. Hopervisidae are large DNA containing enveloped viroses that share a number of properties, including basic mechanisms of virus entry, progeny virus assembly, and exit from the cell. Herpesviruses enter the cell by direct fusion with the plasma membrane or endocytic membranes (13, 14). Progeny nucleocapsids are assembled in the nucleus and exit this compartment by budding at the inner nuclear membrane (51-54). The subsequent steps in virus assembly and release remain controversial (12, 14, 54). The currently most credited view envisions that virions are de-enveloped at the outer nuclear membrane and that the de-enveloped capsids released into the cytoplasm undergo a second envelopment (51-54). The site of cytoplasmic envelopment has not been completely characterned. The Golgi apparatus, trans-Golgi network (TGN) membranes, and occasionally endosomes are usually indicated as platforms for envelopment (1, 6, 14, 34, 46, 54).

Key unanswered questions on herpesvirus envelopment/ egress center on (i) how the curvature of the membrane is destined to become the envelope attained, (ii) which membranes serve as platforms for secondary envelopment, and (iii) which molecular interactions between viral and cellular proteins drive virion envelopment/egress. The aims of this study were (i) to investigate whether components of the MVB biogenesis pathway play a role in herpes simplex virus (HSV) envelopment/egress and (ii) to determine the molecular mechanisms that the virus puts in place in order to exploit the MVB membranes as platforms for building its envelope and to achieve virion egress. While this paper was in preparation, it was reported that a functional Vps4, the ATPase that releases ESCRT components from assembled MVBs, is required for HSV envelopment (17). We report that (i) Vps24/CHMP3, a component of the ESCRT-III complex essential for veside invagination (69), and Vps4 are critical for HSV envelopment/ egress; (ii) the MVB compartment is modified following HSV infection; (iii) glycoprotein B (gB) accumulates at MVB membranes, and a functional MVB biogenesis is required for glycoprotein trafficking and maturation; (iv) gB is ubiquitinated particularly by the lysine 63 residue of obiquitin; and (v) partial deletion of the gB cytoplasmic tail results in a dramatic reduction of ubiquitination and progeny virus envelopment and egress to the extracellular compartment. The results indicate that MVB membranes serve as platforms for HSV envelopment/egress and that sorting of gB to MVB membranes may represent a critical step in the envelopment/egress process.

MATERIALS AND METHODS

Matamatian expression plasmids. The pEX-Vpr4E226Q plasmid encodes the human Vpr4-A protein with a C-terminal FLAO optope containing an E226Q matation. The pEJS-HA-Ub plasmid expresses a hemagghtinin (HA)-tagged writen of wild-type (wt) abiquits, while the pEJS-HA-Ub048R and pEJ

Cell lines and viral strains. Aftern green monkey kidney cells (Vero cells, ATOC mumber CCL-81, COS-7 cells, ATOC mumber CEL-1681) and human kidney cells (293T cells, ATOC mumber CEL-11268) were grown in Dublecco's modified Engle's medium with the addition of 10% heat-inserticated fetal celf wrom (complete medium).

The HSV type 1 (HSV-1) strain F was kindly provided by B. Roizman (Univenity of Chicago, Chicago, IL). Recombinant HSV-1 RED2 was constructed by N. Markowitz and B. Roizman (University of Chicago) by inserting a case the containing a lacZ gene under the control of the HSV-1 BanHI B frequent) at the UL2-UL4-boundary (S). Virases were grown and subjected to their determination by plaque using of Vero cells, as previously described (11). 2037 cells we OCS-7 cells were infected with HSV-1 at the appropriate multiplicities of infection (MOI). The viral incomium was removed after 1.5 h of adsorption, virus absorbed to cells was inactivated with pH3 centre boffer wash, and the cells were overlaid with Dubbeco's modified Engle's needers: containing 2% serum. At different time points, mediam and cells were harvested separately and the virus was timated in Vero cells (11). The KAt AgB HSV was providedly described (2).

Bairy anay. For infectivity determinations, transferred 2007 cells (1×10^4) were plotted in 24 well tissue calcure dishes and infected with EBV-1 R4002 at the MOI of 3 PFU/cell. After 6 h of incohation, infected cells were visualized using the β -galactosidians (β -Gul) substrate X-Gul (5-brone-4-chlore-3-info)(4- β -ogalactosymmetry distance (β -Gul) substrate X-Gul (5-brone-4-chlore-3-info)(4- β -ogalactosymmetry distance (β -Gul) substrate X-Gul (5-brone-4-chlore-3-info)(4- β -ogalactosymmetry distance (β -Gul) substrate X-Gul (5-brone-4-chlore-3-info)(4- β -ogalactosymmetry distance (β -Gul) substrate X-Gul (5-brone-4-chlore-3-info)(4- β -ogalactosymmetry distance (β -Gul (β -Gul)), and incohated with buffiered β -Gul (β -Gul) (β -Gul (β -Gul)), and the renatively, infected cells were solublized to pyramoside (3 mg/ml) and the reaction was quantified by spectrometry (2).

HEV-1 gives protein immunoprecipitation and Wastern blot analysis. The cells were hysel in PES⁶ (PES containing 1% NP-40 and 1% decoycholare) containing protease inhibitors (0.1 mM No-p-myle-ipsine chloromethyl kstone-0.1 mM towinsitionyl phanylalanyl chloromethyl kstone). Immunoprecipitations were carried out with the appropriate antibodien from hysics of infacted or immu-fected cells, as providently described (32). The immunocompletes were harvested

11470 CALISTRUET AL

with protein A. Rephanose (Regra). Proteins separated by notion deduction fass-polyacrylarids gel alterrephanols (SDE-PACIE) were transformed to a Hyhand ECI, altereallikely marriesses (CE Healthclare) and detected with approprise antibodies and estanced-charakterisescence response (CE Healthclare). Anti-gE sociality H1017 (Rambargh-Constwin Institute for Contex Research, Financias, EL) or anti-gE (MS (M) was traid for the language optimized, while not-the antibodies and estanced-charakterisescence response (CE Healthclare). Anti-gE social state of the state of the state of the language optimized, while not-the antibody (Signa), and H117 (Coverse), satisfies antibody (Signa), anti-hyperbol antibody (Signa), and H137 a polychood enterview (DARCO), enhanced-charaklantaneous anti-action interestignation of -howership permittee (CE Healthtani) and enhanced-charakterisecence anti-philis interestignation (CE Healthclare) was the athly interestignation of the response base of the athletic wave for Si mis a distribute proteining expone bases antiperiod is detected where for Si mis a distribute proteining to expone bases antiperiod in the state for Si mis a distribute proteining to expone bases antiperiod in the rest into the instituter, with the antibody (Si, Si).

Physicis and extraction, and data PCR, and results transcription-PCR (RT-PCR) maye DNA extraction was particised as follows. The calls were incebased in 190 of heir before (0.1% Trives X-000, 0.1% HDS, 30 ergent prominant E 10 aiM Trie-HCI-1 mM EDTA) at 56°C for 1 h and boiled for 10 min. Quantitative PCR testing was performed up 3-p3 aligners. Briefly, the estimated DNA was accepted with a suggiously detector system (ABI PRISM 7700) in 25 µJ of PCR mixture containing 12.5 µl Taylelan provinced monter and, 15 proof of each primer, and 10 panel of the probe. The primers amplified a trajeness of the HSV ULS gate (forward primer, 5"ACATCATCAACTFODACTOO-9; sevene primer, 9'-CFCAOGTCCFTCTTCTTCTCC-3'). The monopanic probe sequence was ¹-FAM-ATOTOAACATCOACATOTAOOO-TAME A-J¹, where TAM is 6 carbonyformagele and TAMEA is 6-carbonyminneutrytrhoducates. Thermal cycling conditions were one cycle of 20°C for 10 min and 40 cycles of 87°C for 15 e and 60°C for 1 min. A municipal prive we made by air methol dilutions (how T $\approx 10^6$ is 50 copies) of a constrait planetic containing the region amplitud by the present. The describes through the 10 genomic acpies per maction. The HSV personic copy musher of the sampler was calculand manufactly with 1700 AIG 792598 SDS software and this expressed as numbers serviced DNA copies per cell. The member of cells persons in the PCR min was determined by real-time quantitative-FCR amplification of a β -ploble superiors give (Applied Beisynarta), is recommended by the manufacturer.

[¹⁶5] as the other backeting. 2007 colls considered with the appropriate contract were inferred with HSV-1(F) as the MCC of 10 PFUCedI. At 5 a postifaction, the colls were washed and incohered in methicate drive methan for 1 h, followed by [¹⁶5] nothing in labeling for 15 h. Colls were harvered and lyon in radioir memory adplication many buffer (140 mM NoCl, 8 mM No₂DPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 1% NP-40, 05% and not associate, 0.05% (DS). Foreign corrects were analyzed by EDS-FACE and astronomizing phy.

Interstechter treasure analysis. 2597 calls (1.5×10^3) were grown on glass covervilps. When respired, the calls were other infected with HSV-1 or creasufactual with the appropriate constructs by using the Lipsfordiantike 1000 engager (Invirogen). The calls were then fixed at different time points with other 400 2000 in PRS or scoress-mechanical (1.1, volved) for 5 min at -20° C. Sampler were included with appropriate primery and scoredays methods and with bytthe scores allocations (1.2, volved) for 5 min at -20° C. Sampler were included with appropriate primery and scoredays methods and were more allocation of (1.2, volved) in FEI. The primery artification and were more induced with appropriate primery and scoredays methods and were more induced (1.2, volved) in FEI. The primery artification and were more induced (1.2, volved) in FEI. The primery artification and were induced an albedry (7.40) in Spinorer-associated maintraws protoin 4 (1.2,M09-1; 11-256, sel-31.7), Santa Crart Birnicheologies Inc.), and middle 9.46 to induced in (1.6), Alberts). Physicate is botheological and base are more attra-risks in measure-theological contrasts on physical and restricted in the scoreday products). The calls were observed with neuropeal individuation of an all scoreday products. The calls were observed with neuronal and theory (2.5), and Birnistand. For the scored physical and theory (2.5) were used as a scoredary products.

commenced with the pellworldTN and pR05-V pol2228() planneds or the pR05 construct were lyind in FEST and the cell lyingle were subjected to gR (memopaprecipitation, as discribed above. The initial apprecipitation provide that based to the September based were recorporated in 30 gL of LN descenting baller (0.1% SDS and 0.04 M (initialization) New Engineer Roboty), and the reaction minimum was beamed at 100 Cfree to min. Next, 4 gL of 100 CF reaction befor (0.1% M section chrone [pM 5.2]; New England Bashbe), 5 gL of costs II (50,000 U/m), New Engineer Rischol) and water were added up to 40 gL The reaction infimms was incolubule in 37°C for 1 h. Twenty-five microline of such angle was analyzed by SDS-EACE, followed by Werers bioming mathem

In Bolivity complementation array. The infectivity complementation many was participated as previously described (18). Briefly, COS-7 cells were manufacted with plaunide monoling weigh at $gB_{2,W7}$ and optimized growth factor receptor (ECITE) as a negative control. From lower how re-infected with ETIV-Kits (3 FFU/cell). The vital (membra was removed after 15 h of admention, J. Vinon.



FIG. 1. Effect of Vpx4E238Q and Vpx34-Red on the yield of extracellular and cell-anochined HSV-1. 203T cells (A, B) and COS-7, cells (C, D) were transfected either with an empty vector (pBJ5 or pDiRed2-N1) or with constructs expressing either Vpx4E238Q or Vpx34-Red. Twelve hours after transfection, the cells were infected with HSV-1 at 1 PFU/cell (A, C) or 10 PFU/cell (B, D). At 36 h postinfection, the entracellular (Extracel) and cell-anoclated view were intrated by plaque away in Vero cells.

vices adopted to calle was inscribend with pH 3 stress boffer wash, and othe wars overhid with Deductor's antified Engle's median containing 1% screen. Tweny-four boars inter, motion and calle were barward representy and progeny vices was thread to complementing pB-expressing D8 calls (9).

RESULTS

A functional MVB pathway is required at a late step of HSV1 replication. The most specific way to interfere with MVB pathway biogeneral is to use dominant negative versions of essential components of the pathway. Therefore, in order to determine whether the MVB compartment plays a role in HSV-1 replication, 2037 and COS-7 cells were transferred with a construct expressing a dominant negative form of Vps4 (Vps4E228Q) or a construct encoding the dominant negative version of Vps24/CHMP3 (Vps24-Red). Both dominam negative mutants have been extensively characterized and are known to block the biogenesis of MVBs (81). Twelve hours after transfection, cells were infected with HSV-1(F), at two MOI (1 or 10 PFU/cell). The yield of cell-associated and extracellular virus at 36 h after infection was determined by plaque assay in Vero cells. The results showed a significant reduction in the production of cell-associated as well as re-



FIG. 2. Vp4E228Q (Vp4EQ) or Vp324-led does not affect the early neps of HSV-1 replication. (A to D) 293T cells were transferred with plasmids expressing the dominant negative forms of Vp44 (B) or Vp324 (D) cellular protein or their respective empty vector, pBJ5 (A) or pD4Red2-NO (pReD) (C). Twelve hours after transferoion, the cells were infected with the RSH2 recombinant HSV-1, carrying the *loc2* gene under the control of the ICP-27 immediate promoter (3 FFU/od0) (5). Six hours later, the infected cells were stationed with X-Oal. The panels likestrue light microscope images (magnification, ×).5). (E) Quantification of HSV-1 genomic copies by real-time PCR assay. 203T cells were transferred with the contracts expressing either Vp4E228Q or Vp224-Red or the corresponding empty vectors. Twelve hours pommensiection, the cells were infected with HSV-1 (10 PFU/cell). Twenty-four hours later, the annown of viral DSNA were evaluated by real-time PCR assay. Residu are expressed at numbers of Viral DSNA copies per cell. (F and G) Total RNA were structed from 297T cells undirected with the indexteed plasmide. The RT-PCR assay was performed with plane inpervisepecific for VP16 and gD (F) or the β-actin genes (G). Laters 1, 295T cells transferred with plane intersteed with HSV-1; 2, 200T cells interested with pBIS-Vp4E2BQ and infected with HSV-1; 3, 200T cells transferred with pBIS-Vp4E2BQ and infected with HSV-1; 2, 200T cells interest with pBIS-Vp4E2BQ and infected with HSV-1; 3, 200T cells transferred with pBIS-Vp4E2BQ and infected with HSV-1; C+. Vero cells interest planning vero infected with HSV-1; C+, vero cells interest planning were infected with HSV-1; C+, Vero cells interved with HSV-1; C+, uninfected plasmide. (H) 293T cells transferred with the indicated plasmide were infected with HSV-1; and infected with HSV-1; C+. Vero cells interved with HSV-1; C+, uninfected plasmide. (H) 293T cells transferred with the indicated plasmide were infected with HSV-1; and infected with HSV-1; C+. Vero cells interved

leased virus in the presence of either one of the two dominant negative proteint, irrespectively of the MOI used (Fig. 1A and B). The decreme was observed in both cell lines, irrespective of the fact that virus production was higher in COS-7 than in 293T cells (Fig. 1, compare panels A, B to C, and D).

Instanch as expression of the dominant negative versions of Vps4 or Vps24 might affect receptor distribution at the cell surface and thus decrease the amount of virus taken into cells, we next determined whether the expression of Vps4E228Q or Vps24-Red reduced virus entry. 203T cells expressing either Vps24-Red or Vps4E228Q were infected with the HSV-1 recombinant R8102 (5), which carries the β-Gal gene under the immediate early ICP27 promoter (3 PFU/cell). Numerous rudies have shown that the extent of β-Gal expression is a direct measure of the extent of virus entry into the cells (16). As reported in Fig. 2A to D, no significant difference in numbers of infected cells was observed between cells expreming the dominant negative version of the two proteins and mode-transfected cells.

To better define the nep in HSV replication affected by the expression of the dominant negative versions of Vps4 and Vps24, we next determined whether the expression of the dominant negative mutants affected viral DNA replication or late gene transcription. To this end, the amount of viral DNA present in transfected infected cells 34 h after HSV-1(F) infection (10 PFU/cell) was measured by real-time PCR, using primers that anneal to the HSV-1 DNA polymerase gene. The viral DNA copies differed very tlightly between cells expressing.



FIG. 3. Effect of HSV infection on the morphology of the MVB compariment. 293T cells were infected with HSV-1 and analyzed at 12 or 24 h after infection by immunofluorescence with PAb to 1.AMP-4. The cell nuclei were trained with propidium logide. Cells were observed with a Leica confocut microscope at a ×63 magnification objective. (A) Uninfected 293T cells. (B) 293T cells 12 h after HSV-1 infection. (C) 293T cells 24 h after HSV-1 infection.

either Vps4E226Q or Vps24-Red and the mock-transfected controls (Fig. 2E). Transcription of the late gene was determined by RT-PCR, by employing oligonucleotides annealing to either the VP16- or the glycoprotein D-encoding sequence. The results show no significant reduction in late gene exprestion (Fig. 2F to G) in cells expressing the dominant negative versions of Vps4 and Vps24. According to this finding, no impairment in viral protein synthesis, measured as [255]methionine incorporation, was observed (Fig. 2H). This series of results indicates that the decrease in the amount of progeny HSV assembled and released into the extracellular compariment in the presence of dominant negative ventions of Vp4 or Vpi24 was not due to a defect in virus entry consequent, for example, upon the unavailability or mulocalization of viral receptors, or to a major defect in viral DNA replication and transcription or in viral mRNA translation. The results further show that the decrease in virus release was MOI and cell type independent. Overall, the results confirm and extend previous findings on the role of the Vps4 ATPase in virus envelopment and release (17) and imply that not only the activity of Vps4 but more generally a functional MVB pathway is required for a step in virus replication that takes place after late gene expression and prior to the release of progeny virus into the estracellular medium. This step has been defined by electron microscopy to be at the stage of cytoplasmic envelopment (17).

The morphology of the MVB compartment is modified in HSV-1-infected cells. In HSV-1 infected cells, various compariments are modified in order to render the cell a mitable microenvironmem for virus replication, envelopment, and release (1, 14, 34). We searched fur modifications of the late endosomes or MVB compariment by immunofluorescence with an antibody directed to LAMP-1, a marker of this organelle (27). Confocal microscopy showed that, in uninfected cells, LAMP-1 was dispensed throughout the cytoplaum, as expected. By contrair, in infected cells (12 h and 24 h postinfection), LAMP-1 staining was concentrated in a perionclear region and appeared to be overall increased, possibly reflecting an augmentation of the compariment useff (Fig. 3B and C). The morphological changes are consistent with an involvement of the MVB pathway in HSV replication.

gB colocalizes with the MVB membranes, and its maturation and intracolular trafficking are dependent on a functional MVB bloganesis process. Of the several glycoproteins encoded by HSV, gB, one of the four essential glycoproteins, is known to possess endocycosis metifs and to undergo recycling from the plasma membrane to an endocytic compariment that has not been clearly identified (2). This property is conserved in most herpenviruses (20, 24, 40, 73). We reasoned that gB may be sorted to the MVB compartment. To test this hypothesis, we analyzed by immunofluorescence whether gB colocalizes with the LAMP-1 MVB marker. In infected cells, gB colocalized in part with the MVB membranes, which therefore represent a site of gB accumulation (Fig. 4A to F). Similar results were obtained with 203T cells transfected with a controct expressing wt gB (pgBwt-MTS) (Fig. 4G to I). Thus, the colocalization of gB with MVB membranes is an intrinsic property of gB.

As a further evidence, we asked whether gB localization was altered in cella in which MVB biogenesis was affected by the expression of the dominant negative versions of Vps4, 293T cells were transfected with pgBwt-MTS and pBJ5-Vps4E228Q or the corresponding empty vector pBJ5. Confocal microscopy showed that in the pBJ5-Vps4E228Q-transfected cells, gB localized to a single perimetear region (Fig. 5B). This localization contrasted with gB's distribution at discrete vesicles ob-



FIG. 4. gB accumulates in part at MVB membrares in HSVinfacted and standards cells. (A to F) Deff cells were infected with HSV-1 (10 FFU/cell). Twenty-four hours inter, the cells were stained with MAb to gB (Virusys) and PAb to LAMP-1 and analyzed by contocal microscopy at a ×63 magnification objective. (G to 1) 2037 cells were transfected with a construct expressing gB (pgBwt-MTS). Fourty-eight hours liner, the cells were stained with MAb to gB (Virusys) and a FAb to LAMP-1 and analyzed by confocal microscopy. The arrown point to colocalization spent. (A to C) Low magnification; (D to F) high magnification.



FIG. 5. Effect of blocking MVB biogenesis on gB and gH localization and manuation. 2007 only were contrastened with a construct expressing Vps4E23O (Vps4EQ) or the empty vector pB05, along with the pgBwt-MIS plantid, expressing wt gB (A and C) or gH-MIS-gL-MIS plantids encoding gH(gL (B and D). At 45 a after transfection, the cells were trained with MAb Hill 7 to gB (A and C) or MAb 538 to gH (B, D) and analyzed by confect interactory. Nuclei were mained with propidium indide, (E) 2007 cells were contastented with a construct expressing Vps4E235() or the empty vector pB05, along with the pgBwt-MIS plantid. Forty-eight boors after transfection, gB was intratopercipitated from the cell sparse and transfective with end H (\pm) or the analyzed (-), Sarbies were transfective by SDS-PAGE and Western biolog with PAb to the major HSV-1 ghosproteits. Circles identify the gB forms exhibiting the indicated apparent M₂s. Arrows identify the electrophoretic mobilities of the thickular transfection with effective of the complex complex complex of the third transfective with matter to runs of gB. The electrophoretic mobilities of the molecular mass matters are reported. (F to O) 2037 cells of the diffected with af85. Vps4E220 along with effet englisted interactive of MAb 538 to gH and a PAb to caltedicated, as indicated 2017 cells consteneed with the empty vector pBI 5 to getter with effet with a matter to runs of gB. The electrophoretic file (1 to K) or gH-MIS-gL-MIS (O to Q) were analyzed by confocil profiles or particles with matter to runs of gB and a PAb to caltedicated, as indicated 2017 cells consteneed with the empty werter pBI 5 together with effet the pgBwt-MIS gL-MIS (I to N) were used at a control.

served in pBJ5-transfected cells, which exemplifies the typical distribution pattern of this glycoprotein in both infected and transfected cells (Fig. 5A). The localization at MVBs was a typical property of gB not observed with gH, another estential glycoprotein for HSV and a pattner of gB in virus entry (13). In infected cells, gH accomplates preferentially at the plasma membrane (32). As seen in Fig. 5C and D, gH distribution was not affected by the expression of a dominant negative version of Vps4. To better define that the site of gB accomplation depends on correct MVB biogenesis, we analyzed the electrophoretic mobility of the gB accumulated in cells expressing Vps4E226Q. Figure 5E shows that in pBJ5-transferred cells, gB was present as two bands with apparent molecular masses of 115 and 110 kDa, in agreement with previous data (2). In Vps4E228Q-transfected cells, the predominant form was not the 110 M_t form but a 103 M_t form, absent from pBJ5-transfected cells. This form of gB represented an immature form of the glycoprotein, an assessed by sensitivity to endo H digertion (Fig. 5E). In agreement with the accumulation of an immature form of gB, immunofluorescence analyzin highlighted that in



FIG. 5. HSV-1 gB is objectivitized in infected and in transferred cells (A to C) Electrophoretic and Western bioming analyses of gB and gH immutoprecipitated (IP) from lyates of HSV-1-infected (+) or uninfected (-) 293T cells by means of MAD H1817 to gB or MAD 53S to off. The immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE, followed by Western blothing (WB) with the indicated antibodies (a-HEV-1, PAb to the major HSV-1, gycoproteins; a-HF2, MAD to gH antibody, a Ubi, PAD to ubiquita). (C) The arrow points to the band of obligation and gli. Numbers identify the electrophoretic mobilities of the molecular mass markers. (D to G) 293T cells were contrasfected with a construct expressing wt gB (pgBwt-MTS) (D, E) or a truncated form of gB (gBAnn) (F, G). Cells were also translected with a construct encoding HA-tagged wi obiquida (HA-Ub) or the corresponding pBI5 empty vector, indicated as HA-Ub + or HA-Ub -, respectively. Forty-eight boars postrandoxion, gB was imminoprecipitated with MAb H1817. The separated proteins were analyted by Wentern filming with the antibodies listed above. Braces identify polyabiquinated forms of gB. 97 indicates the electrophotetic mobility of the motecular mass marker.

293T cells expressing Vps4E228Q, gB localized at a site that coincides in part with the distribution of calreticulin (Fig. 5H). Cumulatively, the results indicate a mislocalization of gB and a specific defect in glycoprotein matumation in cells in which MVB biogenesis was blocked. Indeed, the modifications to glycoprotein materation, trafficking, and distributions were observed specifically with gB and not with gH (Fig. 5D and L to Q). gB is ubiquitinated in infected and in transfected cells, and its ubiquitination involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. It is well established that ubiquitination provides a key signal for endosomal sorting of membrane proteins to membranes destined to give rite to MVBs (41). To shed light on the mechanism by which gB is somed to the MVB membranes, we asked whether gB is obiquitinated, gB and gH, as a control, were immunoprecipitated from lyanes of HSV-1(F)infected cells with MÅb H1817 and MÅb 53S, respectively, Immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting with a PAb to the major HSV-1 envelope proteins, MAb H1817 to gH or an ambody to obiquitin. Figure 6A to C show



FIG. 7. Yield of cell-associated and extractituiar visions complemented with $_{4}B_{_{21}mn}$, wr gB, or EGFR. The AgB HSV KAr (9) was grown in 2027 cells transferidly expressing wt gB, gBA₀₄₇, or EGFR as a negative control. At 24 h after infection, the cell-associated progeny virus (A) or virus retented in the extracelular mediam (B) vas thrated in gB-complementing D6 cells.

that gB reacted with the ubiquitin-specific antibody but that no signal was present in the case of gH. To confirm whether gB was obiquitinated and to investigate whether gB obiquitination took place in the absence of additional viral proteins, gB was ectopically expressed together with an HA-tagged vertion of obiquitin and immunoprecipitated with the MAb H1817 to gB. Figure 6D to E show that gB exhibited multiple ubiquitinated form also in transferred cells.

The evoplasmic mil of gB is known to carry signals for gB trafficking (6, 20, 23, 39, 59). We asked whether the gB cytoplasmic tail represents the site for obiquitin addition and whether it plays any role in progeny virus release to the extracellular medium. We made use of a construct expressing a truncated form of gB in which the 37 most-C-terminal aminoacida of the C tail are placed downstream of a stop codon (gBMG7-MTS), gBARF localizes to a large extent to the plasma membrane and fails to localize at the cytoplasmic vesicles typical of wegB accumulation (2), gBaser-MTS was expressed in 203T cells together with the HA-tagged version of objourin. Forty-eight hours later, gB was immunoprecipitated from the cell lysares with MAb H1817 to gB. The require reported in Fig. 6F and G show that gBASS7 was significantly less ubiquiunated than we gB, indicating that signals for ubiquit in addition reside mainly in the gB cytoplasmic tail. The role of the gB cytoplasmic tail in HSV egress was measured by complementing gB deletion visions with gBAGT or wigB as a control. As a further control, the deletion virus was complemented with an unretated glycoprotein, EGFR, Figure 7 shows dramatic decreases in the amounts of cell-associated and extracellular virus when virions were complemented with gB_{ANC} innead of wigh

Ubiquinin is a modifying group that functions in diverse cellular processes (43). Polyubiquinin chains, linked to the target protein through lysine 48, mark proteins for proteasomal degradation (15, 42, 68). In contrast, obiquitin chains linked through the ubiquitin residue lysine 63 impart roles that do not involve the proteasome (19, 25, 77) and include the ubiquinindependent endocytosis of certain plasma membrane proteins (28, 78). In order to determine which ubiquinin residues were engaged in gB obiquitinasion, we transfected 203T cells with constructs expressing obiquirin mutants in which either lysine 48 or lysine 63 were individently replaced with arginine. TwentyVol.: 81, 1007



FIG. 8. Effect of abiquitin minums on gli abiquitinmico. To detect abiquitia conjugates, 2037 cells were transfected with expression vectors encoding the following HA-tagged forms of abiquitin (HA-15b): the wt, K48R minutot, or K63R minutot. Twenty-four hours later, the cells were infected with HSV-1 (10 FFU/cell) (+) or mock infected (-). Twenty-four hours postisfection, gB was immanoprediptured from cell hysnes. Western blotting (WB) was performed with the indicated amittodes (a-HA, MAb to HA; a-HSV-1, PAb to major HSV-1 glycoprotesins). Circles identify the abiquitated forms of gB; values to the right of the dictes indicate their apparent Mg. Arrows point to the 176- and 160-ECa forms of adiquitinated gB absent from the KoBR sample. The values to the right identify the migration positions of molecular mass markers (in kilodatom).

four been later, the cells were infected with HSV-1 and the cell bysates were immunoprecipitated with MAb to gR. The result in Fig. 8 show that in cells transfected with the K48R ubiquin motant, gB exhibited four bands with apparent molecular masses of 170, 160, 150, and 130 kDa. In cells transfected with the K63R mutant, the 170- and possibly the 160kDa bands were absent (Fig. 8). This result provides evidence that gB ubiquination involves in part the Lys63 obiquitin residue implicated in endocytosis.

DISCUSSION

The aim of this work was to determine whether the machinery involved in MVB biogenesis plays a rule in HSV-1 envelopment/egress and to identify possible molecular mechanisms responsible for the recraiment of viral proteins to the MVB pathway. MVB biogenesis was specifically blocked through the case of a dominant negative version of Vps24/CHMP3 (Vps24-Red), an essential component of the ESCRT-III complex responsible for vesicle invagination during MVB biogenesis, and of Vps4 (Vps4E205Q), the ATPase that releases the ESCRT components after veside budding has taken place. Thus, the two mixtant block MVB biogenesis at two different steps in the assembly pathway (69).

We observed the following. (i) A block in MVB biogenesis resulted in a dramatic reduction in the yield of cell-associated and extracellular virus, the effects were MOI and cell line independent. The reductions in virus yield and egress were not consequent to a reduction in virus entry due, for example, to milliocalization or reduced availability of virus receptors and took place after virul DNA replication and late gene transcription and uranulation. The result indicate that both Vps24 and Vps4 are critical for efficient HSV-1 assembly/release, very tikely for HSV envelopment. Inannuch as both the cell-anociated and the extracellular virus yields were reduced, the block in tikely exerted at the envelopment sep. The results confirm the involvement of Vps4 reported recently (17) and extend it by highlighting a critical role of yet another componem of the MVB machinery that functions at a step of MVB biogenesis earlier than that regulated by Vps4. The results presented here fully agree with the detailed electron microscopy analysis showing that the step in HSV-1 replication affected by expression of the dominam negative version of Vps4in virion envelopment (17).

(ii) The MVB compariment was morphologically altered in HSV-infected cells, and appeared to be enlarged compared to that of uninfected cells. Thus, the MVB compariment should be added to the first of organelles that are modified in HSVinfected cells, a list that includes the Golgi apparatus, the cytoskeleton, the nucleoskeleton, the nucleoplasm, and some other organelles (1, 14, 34). It is generally assured that such modifications contribute to rendering the cell a sumble microenvironment for HSV-1 replication and release.

(iii) To shed light on possible molecular mechanism(s) underlying the involvement of the MVB biogenesis machinery in HSV envelopment/egress, we asked whether HSV encodes structural proteins that are sorted to the MVB compartment. We reasoned that a likely candidate could be gB, a glycoprotein highly conserved among members of the Hoperwidae family (67) and an essential glycoprotein for HSV entry into the cell, production of infectious viral particles, in two pathogenesis, and neoroinvasiveness (4, 8-10, 30, 57, 76, 84). The gB cytoplasmic tail carries endocytosis monifs and syncyrial mutations (6, 20, 23, 39, 59). The protein recirculates from the plasma membrane to vesides that tend to enlarge and are positive for some endosomal markers (2, 6, 39, 59). The nature of these vesicles has not been fully characterized. Point or deletion mutations that impair gB endocytosu are associated with altered intracellular transport and with reduced infectious progeny (6, 13, 24, 40). We observed that gB accumulated at membranes positive for the MVB marker LAMP-1. The gB-LAMP-1 coloculization was observed in both HSV-infected and gB-transfected cells, highlighting that this is an intrinsic property of the glycoprotein. A role for the MVB pathway in determining the site of gB accumulation was further supported by the finding that a block in MVB biogenesis through expresnon of the dominant negative Vps4 mutam resulted in the acconnetation of an endo H sensitive immuture form of gB at a morphologically distinct site, partly positive for calesticalin. Overall, these results indicate that gB accuractates at MVB membranes and that the intracellular trafficking of gB requires a correct MVB biogenesis process. These properties were specific to gB and were not observed with gH.

(iv) A well-known mechanism for reculiment of membrane proteins, e.g., receptors, to MVBs is obiquitination, which represents a signal for endosomal torting of membrane proteins to the MVBs and for the targeting of membrane proteins to lysosomal degradation (68, 75). Particularly critical to the latter process is Lyt63-dependent ubiquitination (28). Our results thow that gBwas modified by ubiquitination. This modification was peculiar to gB, as gH did not ondergo such modification. gB obiquitination was observed both in infected and in transfected cells, again highlighting that this is an intrinsic property of the glycoprotein. A ubiquitin mutant carrying the K63R substitution showed that gB ubiquitination involved in part K63, a residue implicated in endocytosis and not in proteasome-dependent degradation (28).

(v) A wealth of studies indicate that the domain critical for gB trafficking is the cytoplasmic tail, known to carry endocytosis motifs and syncytial mutations (2, 6, 14, 20, 26). A gB motant lacking the 37 most C-terminal amino acids of the cytoplasmic tail (gB₂₈₆₇) and impaired in its ability to accuralate at cytoplasmic vesicles (2), was significantly less ubiquitinated than the wt protein. Remarkably, virions carrying in their envelope gBARET were impaired most likely in cytoplasmic envelopments and egress (Fig. 7). Thus, the gB cytoplasmic tail carries most of the signals for gB ubiquitination and, at the same time, plays a critical role in virus envelopment and release. This finding is in agreement with a recent detailed quantitative study showing that virions lacking gB exhibit a reduced ability to egress from the cell (22), as well as with complementation studies with gB mutants (6, 20). Taken together, recent and current data underscore the idea that components normally involved in MVB biogenesis play a critical role in the envelopment of herpes simplex virions at cytoplasmic membranes and point to gB as a candidate protein that links HSV envelopment-egress to the MVB pathway. In the case of homan immunodeficiency virus type 1, the effects of the interaction of Gag with TSG101, an ESCRT I component, vary in different cell lines. Thus, in monocytic cells, the interaction leads to the virus budding directly into the MVB compartment (65). In contrast, in lymphocytic cells, the interaction leads to the recruitment of MVB components to the plasma membrane, which in this way becomes the site of budding (65). The site of gB accumulation as well as its ubiquitination makes it likely that the membranes of the MVBs serve as platforms for HSV envelopment, at least in some cells. Alternatively, the site of envelopment may be membranes other than those of the MVBs, to which components involved in MVB biogenesis are recruited through the intervention of gB and possibly additional viral proteins; candidates are the tegument proteins, predicted to contain L-domain motifs (17). A detailed electron microscopy analysis showed that the HSV budding compartment lacks the characteristic morphology of MVBs (17), consistent with a previous study of pseudorables virus (33). This finding may be explained by the modifications to the compartment induced by the infection observed in our study, or it may imply that membranes other than those of the MVBs are the actual site of envelopment, once MVB components are recruited to them. Deletion of gB does not totally prevent HSV envelopment but reduces the amount of virus assembly and release to the extracellular medium (22). Given the proteomic complexity of HSV, and of herpesviruses in general, it is possible that the mechanisms that govern HSV envelopment and egress are redundant, a view supported by studies of the effect of multiple glycoprotein deletions (21, 22). It is also possible that more than one type of cell membrane serves as a platform for the recruitment of cell and viral components to achieve the ultimate goal of virus envelopment and release. Finally, given that gB is one of the most highly conserved proteins among members of the Heypervisidae family, the involvement of MVB

components for virion envelopment/egress is likely to be a feature common to members of the family.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank our colleagues G. Cohen and R. Eisenberg (University of Pennsylvania) and T. Minson (Cambridge University) for gifts of antibodies, Valeria Bergonzini for anistance with the confocal microscopy images, Elena Sartori for help and technical support, Bettina Strick and Jess von Einem for helpful discussion, Jacob Cohen for critical reading of the manuscript, and Dario Masiero and Massimo Fioretti for anwork.

Alessandra Comin is a Ph.D student in the Virology and Microbial Biotechnologies program at the University of Padual

This work was supported by grants from Cassa di Rispannio di Padova e Rovigo and the University of Padua; grant MIUR-PRIN-2005 to A. Calisiri, G.P., and C.P.; and NIH grant A129873 to H.G. The studies at the University of Bologna were supported by EU con-tract TargetHerpes-VI FP LSHG-CT-2006-037517, grant MIUR-PRIN-2005, and the Fondi Roberto e Cornella Pallotti, C.S. was supported by a posodoctoral fellowship from the Azienda Ospedaliera of Padova, Padova Hospital.

REFERENCES

- 1. Aritabile, E., S. Di Goota, M. R. Torrisi, F. L. Ward, B. Roizman, and G. Compedelli-Finne, 1995. Redistribution of microtubules and Golgi apparathe in herper simplex view-indicated calls and their role in view excey J. Virol. 697472, -7462,
- 2. Aritabile, F., G. Lomberdi, T. Gisuni, M. Capri, and G. Campadelli-Firms. 2004. Compression of UL20p and gK inhibits foll-cell fusion mediated by herpen simplex view glycoposition gD, gH-gL, and wild type gB or an endecytosis-defective gB material and downmodulates their cell material expression J. Virol 78:3015-3030.
- Babes, M. 2005. A protein's final ESCRT. Tradic 6:2-9.
- 4. Baghina, A., L. Hudag, S. Newman, S. Jayachaudra, and K. G. Kousoulas. 1993. Transition of the carbony-terminal 28 amino acids of glycoprotein B specified by herpes simpler virás type 1 maturi smb1511-7 ciánes arteraire. cell fusion, J. Virol, 67:2395-2401.
- 5. Beinen, J. D., and B. Reimann. 1991. The open reading frames ULS, ULA, ULID, and ULIG are dispersable for the replication of herpen simpler virus 1 in cell culture, J. Virol. 62928-044
- 6. Beitie Ortiz de Zarata, I., K. Kaolin, and F. Roomberg. 2004. Effects of matations in the cytoplasmic domain of herpes simpler virus type 1 glyco-
- protein B on invascibilar transport and infectivity. J. Vicol 79:1540-1551. 7. Bonsur, F., J. A. Midilo, M. Q. Wang, K. Nagashima, S. M. de Los Santas, A Rein, and S. P. Gof. 2003. PPPYEPTAP motif is the late domain of human T-cell leubernia viras type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Neidi4 and Tag101. J. Virol 77:11382-11392. 5. Erik, D. J., B. A. Poz, N. A. Dellaca, and S. Person. 1984. Nucleotide
- sequence of a region of the baryon simplex virus type 1 gB gives provide gene: maintions affecting rate of virus entry and cell tasket. Virology 137:115-450. 9. Cal, W.Z., S. Person, S. C. Warner, J. H. Zhou, and N. A. DaLaca. 1987.
- Linker-insertion posségne and restriction-site defetion matations of the gB
- gycoprotein gene of herpes simplex virus type I. J. Virol 41:74-721. 10. Cel, W. H., B. Gu, and S. Person 1988. Role of glycoprotein B of herpes
- simplex view type 1 in viral entry and cell fastor. $\tilde{1}$ Virol 42:25%-2604. 11. Calisiti, A_{\pm} C. Parolin, and G. Paio 2003. Herper simplex vira type 1 can either siepproze er enhance hernen kennendeliekensy virus type I söplication in CD4-positive T lymphocytes J. Med. Wird, Weik3-470.
- Campadall-Firms, G., and B. Rohman. 2008. The opens of herpenviruen from cells: the unanswered quantizers J. Virol. 56:6718-6717.
- 13. Campadelli-Firms, G., M. Amado, E. Aritabila, A. Carrataut, C. Forghieri, I. Gianai, and L. Manoiti. 2007. The antisparity system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. Rev. Med. Virol. [Epub sheed of print.]
- 14. Campadali-Finna, G., and L. Manoiti. 2007. Entry of alphaberperviruse into the cell, p. 92–112 Ja A. Arivia, E. Mocaraki, P. S. Moore, B. Roleman, R. Whitley, and K. Yamanishi (ed.), Haman herperviewees. Cambridge Uni-
- wenity From, Cambridge, United Kingdom. 15. Chest, V., J. W. Teking, A. Bechmeir, D. Marriott, D. J. Edser, D. K. Gonda, and A. Varahavsky. 1989. A multitublepith chain is contract to specific lysize in a targeted short-lived protein. Science 240:1576–1583.
 16. Coechi, F., L. Menotik, V. Di Nimit, M. Loper, and G. Campadoll-Firms. 2004. The horpen simplice view JMP matanet entern receptor-negative J cells.
- through a sovel pathway independent of the known receptors method. HwaA, and methol. J. Wind. 704720-4729.
- Cramp, C. M., C. Yotas, and T. Minesa. 2007. Harpen simplex view type 1 cytoplasmic sevelopment requires functional Vpr4. 3. Virol. 68:7380-7387.
- 18. Demitrov, D. G., and E. O. Freed. 2004. Retrovinus budding. Vinus Res. 19667-182.

Vol. 81, 2007

- Dang L., C. Wang, B. Spanor, L. Yang, A. Brann, J. Yon, C. Slaughter, C. Pickart, and Z. J. Chen. 2001. Activation of the I B kinuse complex by TRAF6 requires a disarte objectin-coopering enzyme complex and a unique polyabiquitin chain. Cell 109:251–361.
- Fan, Z., M. L. Grantham, M. S. Smith, E. S. Anderson, J. A. Cardelli, and M. I. Maggeridge. 2002. Transmission of herpen simplex virus type 2 glycoprotein B increases its cell sorface expression and activity in cell-cell fusion, but these properties are unrelated. 2. Virol. 76:0271–7283.
- Permeworth, λ., Κ. Goldmaille, and D. C. Johnson. 2003. Harper simplex virus glycoproteins gD and gE/gI serve essential but reducedant functions storing sempiaition of the virion envelope in the cytoplasm. J. Virol. 77:8481– 8459.
- Ferrarworth, A., T. W. Winner, M. Webb, R. Roller, G. Cahen, R. Eitenberg, and D. C. Jahnson. 2007. Elergen simplex virus glycoproteins gB and gH function in fusion between the which envelope and the outer nuclear membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10:410187–10192.
- Favoresi, H. W., H. J. Naswyack, H. M. Hakevych, P. Van Ossiwidi, T. C. Matsukitar, and M. B. Penssert. 1989. Actibody-induced endocytonic of viral glycopionics and major histocompatibility complex class I on pseudorabias viras-infected monocytes. J. Gen. Virol. 40(1263–129).
- Favorosi, R. W., G. Van Minnebrugger, H. J. Narwynch, L. W. Enquiet, and M. B. Pannaeri. 2002. A tyraxine-based motif in the cytoplannic tail of pseudorables winn glocoprotein. B is important for both antibody-induced internalization of viral glycoproteins and efficient cell-to-cell aprend. J. Virol. 76:0455-0451.
- Jinky, D., S. Sadia, B. P. Menia, P. Beacher, D. J. Rober, S. T. Crooka, and Y. Chen. 1994. Inhibition of protochysis and cell cycle programion in a multibliquitization-deficient yeast motant. Mol. Cell. Biol. 14:0501–0509.
- Fester, T. P., J. M. Meinnowi, and K. G. Konsoules. 2001. An alpha-beloal domain within the carboxyl termines of horpess simplex wires type 1 (HSV-1) glycoprotein B (gB) is susceinted with cell fusion and resistance to heporin. Inhibition of cell fusion. Virology 297:18–29.
- Feiter, C. F., & Peerze, L. J. Hewleit, and C. B. Hopkins. 1996. Multivesizelar endowment containing internationd EOP-EOP receptor complexes matters and then fase directly with [procedure. J. Cell Biol. 132(101):4023.
- Galan, J., and R. Hagunasan-Taspin 1997. Ubiquitin ips53 in involved in ubiquitination of a year plasma membrane protein. EMBO 2, 1865847-5854.
- Garras, J. E., U. K. von Schweiter, O. W. Poratileo, S. G. Morkara, K. H. Zavitz, H. B. Wang, D. A. Weitziein, K. M. Smay, M. Cois, R. L. Rich, D. G. Myutio, and W. I. Sandquint 2001. Tig101 and the vacuable protein sorting pathway are concutal for HIV-1 bedding. Cell 107:27–68.
- Gerdin, Y., J. Beyer, B. Lorenkeri, and T. C. Mottenletter. 2003. Paradorables: virus expressing boving berparvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropien and increased neurovirulence. J. Virul. 74817-827.
- Gienei, T., L. Menotti, and G. Campadalli-Flume. 2023. A heptical repeat in herpen simplex view 1 gH, located downstream of the alpha-helix with attributes of a fusion peptide, in critical for view entry and fusion. J. Virol. 79:7042–7049.
- Gianat, T., R. Fais, C. Borgamini, G. Lauaz, and G. Campadali-Firma. 2005. Hydrophotic sipha-believe 1 and 2 of herpen simplex view gH interact with lipids, and their mimetic peptides enhance view infection and fusion. J. Vind. 20:0190–3126.
- Granzov, H., B. G. Klapp, W. Fusha, J. Veita, N. Orientoler, and T. C. Meitankiter. 2001. Egress of alphaberparities: comparative ultrastructural study. J. Virol 75:2675–3684.
- Harley, C. A., A. Daugepis, and D. W. Wilson. 2001. Characterization of herpen simplex virus-containing organelles by subscillable fractionation: role for organelle acidification in amenity of infections particles. J. Virol. 78: 1225-1251.
- Hertiteb, B., and W. Weimenhern. 2006. Flowing assembly and budding. Virology 344:64-70.
- Harty, R. N., J. Paragas, M. Sadol, and P. Palasa. 1999. A proline-rich motif within the matrix proxim of variable storantikis virus and rabies virus interacts with WW domains of collabor proteins: implications for virul budding. J. Virol. 79(2):21–2029.
- Harty, R. N., M. E. Brewn, G. Wang, J. Hubregins, and E. P. Hayan. 2000. A PPeY most within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligane: implications for filovirus building. Proc. Nucl. Acad. Sci. USA 37:13671–13676.
- Harty, R. N., M. E. Brown, J. P. McGettigen, G. Wang, H. R. Jayakar, J. M. Hatkengins, M. A. Weitt, and M. J. Schneil. 2001. Rhabdoviruses and the collular tologalito-protonocous system: a building interaction. J. Virol. 78: 10623–10629.
- Heinemen, T. C., and S. L. Hell. 2001. VZV g8 endocritosis and Golgi localization are mediated by YXXphi month in in cytophasmic domain. Visology 20042–40.
- Heinemen, T. C., and S. L. Hell. 2002. Role of the variatile-contervirus gB cytophamic domain in gB transport and viral agrees. J. Virol. 74670–699.
 Hicke, L., and R. Duese. 2003. Regulation of membrane protein transport by
- Hicks, L., and R. Dues. 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. Annu. Rev. Coll Dev. Biol. 19:141– 172.

- Bochetremer, M. 1996. Ubiquite-dependent protein degradation. Annu. Rev. Genet. 38465–639.
- Hoinsson, R. M., and C. M. Pickeri. 1999. Nonconstrain MMS2-exceeded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of newel polyubiquitin chains for DNA repair. Cell 96:545–653.
- Jassacely, L. D., and Y. Kawaoka. 2004. Filovirus building. Virus Res. 184(10):108.
- Jayakar, H. R., B. Jeolendra, and M. A. Whit. 2004. Rhabdovirus assembly and building. Virus Res. 186(1)7–132.
- Johrson, D. C., and M. T. Haber. 2002. Directed agrees of azimal viewee promotes cell-to-cell spread. J. Virol. 76:1–6.
- Katunaan, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Ener. 2002. Receptor downregulation and multivesteniar body sorting. Nat. Rev. Mol. Cell Teol 3:453–905.
- Kikonyego, A., F. Bonener, M. L. Vana, Y. Xiang, A. Aiyar, C. Carler, and J. Lein. 2001. Proteins related to the Nedd4 family of originatic protein ligants interact with the L domain of Ross success virus and are required for Gag building from cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11109–11204.
- Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniam. 2001. HIV-1 and Ebola. virus encode small populate motifs that recruit Tagi01 to size of particle smembly to facilitate egrens. Nat. Med. 7(13)2–(3)9.
- Martia-Serrano, J., D. Feren-Cabellers, and P. D. Bioniam. 2004. Context dependent effects of 1-domains and obiquitination on viral budding. J. Virol. 70:2254–2563.
- Motteeleiter, T. C. 2002. Herpervirus assembly and agrees. J. Virol. 76:1537– 1547.
- Mettesletier, T. C. 2004. Bedding events in herpervision morphogenesis. Virus Res. 194(167-190).
- Meitarkiter, T. C., B. G. Klupp, and H. Granzow. 2006. Herpervirta suscerbly: a tale of two membranes. Curr. Opin. Microbiol. 9:423–429.
- Mettenkeiter, T. C., T. Mirawa, and P. Wild. 2006. Egrem of alphaberpervirance. J. Virol. 30:1610–1612.
- Minnwash, E. G., P. Borvini, and L. Neckera. 1989. The measurement of obiquities and obiquitanted proteins. Electrophorenis 28:418–628.
 Minnwash, F. G., and L. M. Neckera. 2005. Measuring obiquitin conjugation.
- Minnwagh, B. G., and L. M. Neckers. 2005. Measuring ubiquitin conjugation in cells. Methods Mol. Enel. 381:223–241.
- Mitchell, B. M., and J. G. Stovens. 1996. Neuroizvestve properties of harpen singlez virus type 1 glycoprotein variants are controlled by the immunoresponse. J. Immunol. 196246–255.
- Morita, E., and W. I. Sundquisi. 2004. Retroving building. Annu. Rev. Coll. Dev. Biol. 28 385–425.
- Moderf, R., B. G. Kiepp, A. Karger, and T. C. Mottenidier. 2000. Effects of transation of the entropy termines of pseudombion virus glycoprotein B on infectivity. J. Virol. 74(7):57–7145.
- Ott, D. E., L. V. Coren, E. N. Cherkova, T. D. Gagliardi, and U. Schubert. 2000. Ubipatization of HIV-1 and MuLV Gag. Visology 270:111-121.
- Ott, D. H., L. V. Coren, R. C. Soweier, I. I., J. Adama, K. Naganhima, and U. Schubert 2002. Equine infections seemia wires and the abiquitin-protonsome system. J. Virol. 76:3038-3044.
- Oit, D. H., L. V. Coren, R. C. Sowder, I. I. J. Adams, and U. Schubert. 2003. Retrovirence have differing requirements for protessome function in the building process. J. Virol. 77:3384–3383.
- Painek, A., V. Chen, and J. W. Wills. 2000. Ubiquitate part of the retrovirus building machinery. Proc. Soil. Acad. Sci. USA 97:13039–13074.
- Pataski, A., V. Chou, R. Li, R. C. Meatalero, and J. W. Wills. 2002. Budding of equine infection anamia virus is insensitive to protessome inhibitori. J. Virol. 762541-2547.
- Felcher-Matthews, A. B. Kramer, and M. Marnh. 2003. Infectious HIV-1 seconders in late and owners in primary macrophages. J. Cell Biol. 162:443– 455.
- Peng, T., M. Ponce de Leon, M. J. Noveiny, H. Jiang, J. D. Lambris, G. Dubin, P. G. Speer, G. H. Cohen, and R. J. Kinnberg, 1998. Structural and antigenic analysis of a truncated form of the horpes simplex virus glycoprotatin gH-gL complex. J. Virol. 72:6992–6103.
- Fursies, L. 1994. Function of algoprotuin B homologues of the family herpervirtiles. Infect. Agents Dis. 2:5-23.
- 68. Nekari, C. M. 2000. Ubiquizin in chains. Trends Nochem. Sci. 25:544-646.
- Piper, R. C., and D. J. Katemann. 2007. Biogenesis and function of multivesizetic bodies. Annu. Rev. Cell Dev. Biol [Epsty about of print] doi:10.1146/ annurev.cellbia.23.002506.123313.
- Perrillon, O., S. L. Alera, D. R. Davia, and W. I. Sundquist. 2002. Structure of the TaylOI UEV domain in complex with the FTAP modif of the HIV-1 p5 protein. Nat. Struct. Hol. 2:d12–317.
- Perrillos, O., S. L. Alan, R. L. Rich, D. G. Mynka, D. R. Davis, and W. I. Swalopist 2002. Structure and functional interactions of the Tagl01 UEV domain. EMISO J. 21:237-3405.
- Patierman, D., R. B. Pepinsky, and V. M. Vogt. 1990. Ubiquitin in avian leakania virus particles. Virology 17:4633–637.
 Radasky, K., M. Richmann, T. Mockanhampi, E. Begnar, H. Kara, A.
- Radask, K., M. Elchmann, T. Mockanhaupi, E. Begner, H. Kara, A. Els-Hubinger, and M. Rachka. 1996. Retrieval of human systemogalovirus glycoprotein. B from the infected cell surface for virus envelopment. Arch. Virol. 140:357–572.
- 74. Schubert, U., B. E. Ott, E. N. Chertove, R. Walker, U. Termer, M. F.

Principits, J. R. Bennink, H. G. Krausnich, and J. W. Yawiell. 2000. Protransme inhibition interferes with gag polyprotein processing release, and mataration of HIV-1 and HIV-2 Proc. Natl Acad. Sci. USA 97:13057-13762

- 73. Singryold, T., K. Patini, L. Malarod, and H. Stermark. 2006. Endouveral and non-endosomal functions of ESCRT proteins. Trends Cell Biol. 16/317-326.
- Spese, P. G. 1993. Membrane Italian induced by harpen simplex virus, p. 201-232. Is J. Bentz (ed.), Viral fusion mechanisms. CRC Press Inc., Ann. Arbor, ML
- 77. Spines, J., R. R. Goll, G. Dilmar, F. Sherman, M. Karin, and D. Finky. 2000. Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. Cell 10267-76.
- Springed, J. Y., J. M. Galen, R. Hagamanar-Taupis, and D. Andra. 1979. NEM+-induced downregulation of the Soccharomyce corevisite Cauly per-mense involves in obligationation with lysize-S3-linked chains. J. Cell Sci. 112(1375-1383)
- 79. Strack, B., A. Callairi, M. A. Accola, G. Pali, and H. G. Göttinger. 2000. A

role for ubigable ligner recreitment in retrovirus release. Proc. Nati. Acad. Sci. USA #713063–12068

- Sirach, B., A. Caliniri, and H. G. Göttlinger. 2002. Late susceptibly domain function can exhibit context dependence and involves abiquitin residues implicated in anticeptonia. J. Virol. 76:5472–5479.
- 61. Strick, B., A. Califiti, S. Craig, E. Popela, and H. G. Göttingen. 2003. AIFIALIX is a binding parmer for HIV-1 p6 and ELAV p9 functioning in view bedding. Cell 1145692-659.
- 62. Telainots, T., and A. Portner. 2004. Molecular mechanism of paramyzovirus building, Viria Res. 108(133-145).
- Ursis, S., T. Neda, Y. Kawaseka, H. Yokosawa, and J. Yanada. 2006. Collabor factors required for Lanux view bodding. J. Vicol. 804191–4195.
 Yaham, S. A., and J. G. Sizwan. 1993. Observations is a specific deter-minant of herpes simplex virus type 1 neuroinvasivenus. J. Virol. 67:5945– 1993. 5554
- 65. Yanada, J., E. Hunter, M. Nakaa, and H. Shida. 2002. Perectional involvement of a novel Nedd+Ike abigatia Igase on retrovine bodding. EMBO Rep. 3426-640.