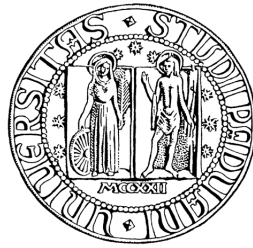


Università degli Studi di Padova



SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI ISTOLOGIA, MICROBIOLOGIA E
BIOTECNOLOGIE MEDICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA
XXIII CICLO

INTERAZIONE TRA PROTEINE VIRALI E CELLULARI COINVOLTE NELLE FASI TARDIVE DEL CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA FELINA

DIRETTORE DELLA SCUOLA: **CH.MO PROF. GIORGIO PALÙ**

SUPERVISORE: **CH.MA PROF.SSA MARIA CRISTINA PAROLIN**

DOTTORANDO: **DOTT. MICHELE CELESTINO**

*In quell'istante ebbero termine i libri,
l'amicizia, i tesori senza sosta accumulati,
la casa trasparente che tu e io costruimmo:
tutto cessò d'esistere, tranne i tuoi occhi.*

A mamma

INDICE

1. SOMMARIO	1
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUZIONE	9
3.1 Il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV)	9
3.1.1 Morfologia del virione	11
3.1.2 Genoma	12
3.1.3 Ciclo replicativo	15
3.1.4 Patogenesi dell'infezione	17
3.1.5 Le poliproteine Gag e Gag-Pol di FIV	18
3.2 I late domains nella gemmazione dei virus dotati di envelope	22
3.3 I multivesicular bodies	24
3.3.1 Ruolo e caratteristiche della proteina AIP1/Alix	30
3.4 Fattori cellulari dell'ospite in grado di interferire nel ciclo di replicazione retrovirale	33
3.5 Teterina	35
3.5.1 Caratteristiche generali di BST2	36
3.5.2 Meccanismo d'azione antivirale di BST2/teterina	38
3.5.3 Antagonisti virali	39
3.5.4 Ruolo di teterina nell'evoluzione dei lentivirus e nella pandemia dell'AIDS	42
4. OBIETTIVI	45
5. MATERIALI e METODI.....	47
Materiali	47
5.1 Linee cellulari.....	47
5.2 Plasmidi.....	47
5.3 Oligonucleotidi.....	51
Metodi	53
5.4 Quantificazione degli acidi nucleici.....	53
5.5 Competenza e trasformazione batterica	53
5.6 Preparazione di DNA plasmidico.....	54
5.7 Mutagenesi	55
5.8 Estrazione dell'RNA e tecniche di RT-PCR.....	56
5.9 Reazione a catena della polimerasi (PCR).....	57
5.10 Restrizioni enzimatiche.....	57
5.11 Tecniche di clonaggio	58
5.12 Sequenziamento dei plasmidi.....	78
5.13 Tecniche di trasfezione	79
5.14 Immunofluorescenza.....	84
5.15 Produzione di virus-like particles (VLPs) e di virioni	85
5.16 Purificazione delle VLPs mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio (virion pelleting).....	85
5.17 Preparazione dei lisati cellulari	86

5.18 Elettroforesi di proteine denaturante (SDS-PAGE)	86
5.19 Western Blotting.....	87

6. RISULTATI

RUOLO DELLA REGIONE GAG DI FIV

NELL'INTERAZIONE CON PROTEINE CELLULARI

COINVOLTE NELLA GEMMAZIONE91

Premessa	91
6.1 Caratterizzazione dei domini tardivi della regione Gag di FIV.....	92
6.2 AIP1/Alix ripristina il rilascio dei mutanti del late domain PSAP in modo indipendente dal motivo LLDL	98
6.3 Mutagenesi della regione nucleocapside di Gag di FIV	102
6.4 Ruolo delle cisteine in posizione 377, 390, 396 e 409 degli zinc-fingers del nucleocapside e dei domini tardivi mutati di Gag sul rilascio delle particelle simil-virali	105
6.5 Ruolo dei residui basici aminoterminali del nucleocapside e dei mutanti del late domain di Gag sul rilascio di particelle simil-virali	112

7. RISULTATI

FATTORI CELLULARI DELL'OSPITE IN GRADO DI

INTERFERIRE NELLA GEMMAZIONE DI FIV: TETERINA

.....117

Premessa	117
7.1 Identificazione e clonaggio del prodotto del gene bst2 del genoma felino	117
7.2 Valutazione della capacità antivirale di teterina felina.....	125
7.3 Localizzazione cellulare di cBST2	126
7.4 Dimerizzazione di cBST2.....	127
7.5 Attività antivirale di teterina felina nei confronti del Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV).....	128
7.6 Ricerca di un fattore virale in FIV in grado di antagonizzare l'effetto di teterina felina: Envelope e Orf-A	130

8. DISCUSSIONE.....135

9. ABBREVIAZIONI.....149

10. BIBLIOGRAFIA.....153

11. RINGRAZIAMENTI.....173

12. PUBBLICAZIONI ALLEGATE.....175

1. SOMMARIO

Il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) è un lentivirus che infetta i non primati e causa una sindrome da immunodeficienza nel suo ospite, il gatto domestico, simile all'AIDS nell'uomo. FIV presenta numerose omologie molecolari e patogenetiche con il Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 (HIV-1), rappresentando quindi un ottimo modello per lo studio di HIV-1 e per lo sviluppo di vaccini e di vettori per la terapia genica. In questo contesto, la caratterizzazione dei determinanti virali e cellulari, che regolano il rilascio delle particelle dalle cellule infettate, riveste un ruolo cruciale non solo dal punto di vista dello studio della biologia del virus, ma anche per l'identificazione di nuovi target terapeutici e per lo sviluppo di vettori lentivirali basati su FIV, da impiegare per l'espressione ed il trasferimento di transgeni in cellule eucariotiche. In particolare, la nostra attenzione si è focalizzata sulla fase di gemmazione. La sola poliproteina strutturale Gag di FIV, così come quella degli altri retrovirus, è in grado di assemblarsi e mediare il rilascio di particelle simil-virali (*Virus-like particles*, VLPs) in assenza di altre proteine/determinanti virali. A tal fine, questi virus ad RNA dotati di *envelope* gemmano dalle cellule infettate, sfruttando il *pathway* dei *Multivesicular Bodies* (MVB), attraverso l'ubiquitinazione delle proteine strutturali e/o la loro diretta interazione con proteine cellulari, le quali sono coinvolte nella biogenesi di questi organelli, mediante corti motivi aminoacidici ricchi in prolina, noti come domini tardivi (*Late domain* o *L domain*).

Il presente lavoro di dottorato si è proposto di caratterizzare le fasi tardive del ciclo replicativo di FIV. L'attenzione è stata focalizzata sullo studio i) delle interazioni tra proteine cellulari e virali coinvolte nella gemmazione e ii) dei fattori dell'ospite in grado di interferire a livello di tale processo.

Nella prima parte della ricerca è stato caratterizzato il contributo della poliproteina Gag nel rilascio delle particelle virali e il *pathway* cellulare impiegato da FIV durante la gemmazione. E' stato possibile dimostrare come FIV sia strettamente dipendente dal dominio tardivo PSAP, contenuto nella regione carbossiterminale p2 di Gag, per il rilascio delle particelle virali, a prescindere dalla presenza di una proteasi virale attiva. E' stato inoltre documentato come il suddetto dominio tardivo permetta a FIV di sfruttare il *pathway* dei MVB per gemmare in modo efficiente dalle cellule e come questo sia correlato all'ubiquitinazione di Gag, possibile solo in presenza del dominio tardivo attivo. Nel tentativo di caratterizzare ulteriormente il ruolo dell'intera regione p2 nella gemmazione, è

stato osservato che la capacità di produrre VLPs da parte del mutante con il dominio tardivo PSAP inattivato poteva essere ripristinata over-esprimendo nelle stesse cellule la proteina cellulare AIP1/Alix. Significativamente, analizzando la regione p2 è stato possibile identificare un motivo LLDL a valle di PSAP, reminiscente del *late domain* YPDL, che in EIAV risulta essere essenziale per la gemmazione virale in quanto interagisce con la proteina cellulare AIP1/Alix. E' stata quindi verificata la possibilità che tale motivo avesse funzione di dominio tardivo in FIV. In particolare, è stato dimostrato come la completa distruzione del motivo LLDL, nel contesto del dominio tardivo PSAP intatto, non abbia alcuna funzione nella gemmazione del virus. E' stata quindi vagliata la possibilità che il motivo LLDL potesse funzionare da *late domain* ausiliario coinvolgendo, in alcuni casi, la proteina AIP1/Alix. Si è quindi proceduto ad analizzare la capacità di AIP1/Alix di ripristinare il rilascio di VLP di mutanti a livello del dominio p2 di Gag. E' stato dimostrato come la over-espressione di AIP1/Alix sia in grado di ristabilire la gemmazione dei mutanti difettivi a livello del dominio tardivo e di come tale proteina sia incorporata nelle stesse VLPs, in assenza di un'interazione con il motivo LLDL. I dati ottenuti indicano come il motivo LLDL non rappresenti per FIV un dominio tardivo ausiliario. Nel contesto di HIV-1, di recente è stato proposto che il dominio nucleocapside (NC) cooperi con p6 nel reclutamento delle proteine cellulari richieste per la gemmazione virale ed, in particolare, è stato dimostrato come gli *zinc finger* presenti a livello di NC rappresentino addizionali siti di legame per la proteina AIP1/Alix. Alla luce di queste evidenze sperimentali, è stato quindi analizzato il contributo del NC di FIV nella cooperazione con i domini tardivi nella gemmazione e la sua possibile interazione con AIP1/Alix. A tale scopo, sono stati generati dei costrutti FIV-derivati recanti specifiche mutazioni a livello di NC in combinazione con alterazioni nella regione carbossiterminale. Diversamente da quanto accade in HIV-1, è stata dimostrata l'assenza di coinvolgimento del nucleocapside di FIV nel ripristino della gemmazione di tali mutanti del *late domain*, in presenza di sovraespressione di AIP1/Alix.

Nella seconda parte della ricerca, sono stati analizzati alcuni aspetti molecolari alla base della specie-specificità degli eventi tardivi della replicazione di FIV. Recentemente in letteratura è stato riportato come la proteina cellulare umana teterina (o hBST2) sia in grado di interferire con il rilascio delle particelle virali di HIV-1 dalle cellule infettate e come tale virus abbia evoluto specifiche contromisure per antagonizzarne l'effetto. Sulle basi di tali studi, in seguito ad una profonda analisi bioinformatica nel genoma felino, è stato possibile identificare l'ortologo della proteina umana BST-2/teterina, rinominato cBST2 o teterina

felina, e ne è stata valutata la funzionalità. I risultati indicano come cBST2 non sia in grado di interferire con il rilascio di FIV, in quanto il suo effetto è antagonizzato dall'azione combinata dalla proteina strutturale Env e della proteina accessoria Orf-A. Inoltre, in accordo con la specie-specificità di questi fattori antivirali, è stato dimostrato come la forma felina di BST2 sia in grado di impedire il rilascio delle particelle virali di HIV-1, lentivirus che infetta i primati umani, e come teterina umana, invece, blocchi la gemmazione di FIV, lentivirus che infetta i non primati.

I risultati ottenuti permettono di approfondire le conoscenze legate alla biologia di FIV, in particolare quelle relative ai meccanismi cellulari, condivisi oppure altamente divergenti, con il ciclo biologico di HIV-1 e possiedono profonde implicazioni nell'uso di FIV come modello per l'AIDS e nelle applicazioni in ambito biotecnologico e veterinario.

2. ABSTRACT

Feline Immunodeficiency Virus (FIV) is a non-primate lentivirus that causes an immunodeficiency syndrome in domestic cats, that is striking similar to AIDS in humans. FIV is similar to Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) in many molecular and biochemical properties, thus representing an attractive model for AIDS research in many different aspects ranging from pathogenesis to therapeutic approaches. In this context, understanding the interplay between viral and host factors plays a crucial role in the efforts for elucidating the molecular mechanisms involved in virus pathogenicity and thus for the development of effective therapeutic and vaccine approaches. In order to fully take advantages of these important properties and considering that the present understanding of FIV biology lags behind knowledge accumulated on HIV, different aspects of FIV life cycle need to be further investigated. In particular, we focused our attention on viral budding. As for all the other retroviruses, FIV Gag can assemble and lead to Virus Like Particles (VLPs) budding from cells in the absence of other proteins / viral determinants. To accomplish this, RNA-enveloped viruses bud from infected cells by exploiting the Multivesicular Body (MVB) pathway. In this context, ubiquitination of structural viral proteins and their direct interaction with cellular factors involved in the MVB biogenesis through short proline rich regions, named Late domains (L domains), are crucial mechanisms.

The overall goal of the study is to characterize the late steps of FIV replication. In particular, our attention has been focused on i) dissecting viral/cellular protein interactions involved in budding and ii) the identification of the host factors that can interfere in this process.

Firstly, we focused our attention on the role of the major structural FIV Gag protein in viral budding and the pathways that FIV exploits for its budding. Here we report that, in contrast with HIV-1, FIV is strictly dependent for its budding on a ‘‘PSAP’’-type L-domain, mapping in the carboxy-terminal region of Gag, irrespective of a functional viral protease. Moreover, we demonstrate that FIV egress is related to Gag ubiquitination, that is linked to the presence of an active L-domain. We demonstrate that FIV, thanks to its L domain, hijacks the MVB biogenesis machinery to execute its efficient exit from cells. In order to further characterize the contribution of the entire p2 region in FIV egress and the role of cellular proteins in the process, we noticed that a p2 mutant characterized by the complete disrupting of the PSAP late domain could be rescued by the over-expression of the cellular protein AIP1/Alix. Interestingly we were able to identify

in p2, down-stream the PSAP sequence, an LLDL motif, which is reminiscent of the YPXnL L-domain. It is well known that in EIAV, a sequence “YPDL”, mapping at the level of Gag p9, is essential for viral budding through the interaction with AIP1/Alix. In particular, we demonstrated that the complete destruction of LLDL motif, in the context of PSAP late domain intact, has no impact in the release of FIV. Next, we analyzed whether the LLDL motif may function as an auxiliary L-domain in the context of FIV-Gag, and, specifically, mimicking the YPXnL type of L-domains. We were able to show that, also under these conditions, AIP1/Alix is still capable of rescuing VLPs production and any p2 sequences are strictly necessary for its incorporation in FIV VLPs. The data obtained indicate that the LLDL motif does not represent an auxiliary late domain for FIV.

In the context of HIV-1, it has recently been proposed that the nucleocapsid domain (NC) cooperates with p6 in recruitment of cellular proteins required for viral budding and, in particular, it has been shown that the zinc finger present in NC represent additional binding sites for AIP1/Alix. To investigate this aspect in FIV, we analyzed the contribution of the NC domain in the cooperation with the late domain in the budding and its possible interaction with AIP1/Alix. Thus, we mutagenized FIV zinc finger motifs and, in particular, we generated different NC mutants in combination with alterations at the level of the carboxyterminal region of Gag. In contrast to what occurs in HIV-1, we demonstrated the absence of involvement of FIV NC in the budding rescue ability of AIP1/Alix.

In the second part of the research, we analyzed some molecular aspects underlying the specie-specificity of the late step of FIV replication. Recently it has been reported that the human cellular protein tetherin (or hBST2) is able to block the release of HIV-1 viral particles from infected cells and that HIV-1 has evolved specific countermeasures to antagonize its effects. Starting from these findings, by means of a detailed bioinformatics analysis in the feline genome, it was possible to identify the ortholog of the human protein BST2/tetherin, renamed cBST2 or feline tetherin. We were able to show that cBST2 is unable to interfere with FIV release, since its effect is antagonized by a combined action of the structural Env protein and the accessory Orf-A protein. Furthermore, in agreement with the specie-specificity of these antiviral factors, we demonstrated that the feline tetherin is able to prevent the particle release of HIV-1, a human primates lentivirus, and that human tetherin blocks the particle release of FIV, a lentivirus which infects the non human primates.

In conclusion our data bring to light peculiar aspects of FIV biology and, in particular, put the basis for the identification of cellular mechanisms either shared

or highly divergent between FIV and HIV-1, with profound implication for the use of FIV as model for studying HIV pathogenesis and therapy.

3. INTRODUZIONE

3.1 Il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV)

Il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV, *Feline Immunodeficiency Virus*) appartiene alla famiglia *Retroviridae*, genere *Lentivirus*, ed è stato isolato per la prima volta in California nel 1987 (Pedersen *et al.*, 1987).

La famiglia *Retroviridae* comprende un vasto ed eterogeneo gruppo di virus isolati da numerose specie di vertebrati, caratterizzati da genoma diploide ad RNA a polarità positiva e dotati di *envelope*. L'elemento distintivo di questi virus è il loro ciclo replicativo: in seguito all'ingresso della particella virale nella cellula ospite, l'RNA genomico viene retrotrascritto in una molecola di DNA a doppio filamento che verrà integrata nel genoma della cellula stessa. Entrambi questi processi vengono mediati da enzimi virali, la retrotrascrittasi inversa e l'integrasi (Varmos *and* Brown, 1989). La forma integrata del DNA virale, chiamata provirus, servirà come stampo per la formazione degli RNA virali e delle proteine necessarie per la costituzione della progenie virale. Dopo l'integrazione, il DNA provirale si comporta come un gene cellulare, viene cioè tramandato alle cellule figlie e viene trascritto dalla RNA polimerasi II della cellula ospite.

I retrovirus sono classificati in sette generi in base al tropismo e alla patogenicità: alpharetrovirus, betaretrovirus e gammaretrovirus, considerati virus a genoma semplice, e deltaretrovirus, epsilonretrovirus, lentivirus e spumavirus, ritenuti virus a genoma complesso. I primi hanno un genoma caratterizzato dai geni *gag*, *pol* ed *env*, mentre i retrovirus "complessi" possiedono prodotti genici accessori importanti per la replicazione e la diffusione virale *in vivo*.

I lentivirus (dal latino *lenti* ovvero lento) causano disordini di tipo degenerativo a carico del sistema immunitario e nervoso, caratterizzati da una lenta progressione della malattia. A questo genere appartengono virus in grado di infettare i primati, tra cui il Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 (HIV-1) e il Virus dell'Immunodeficienza di Scimmia (SIV), così come virus che infettano i non primati, quali il Virus dell'Anemia Infettiva Equina (EIAV) e FIV. Ceppi specie-specifici di FIV sono stati descritti nel gatto domestico (*Felis catus*), nel puma (*Puma concolor*), nel leone (*Panthera leo*) e nel leopardo (*Panthera pardus*) (Troyer *et al.*, 2005).

La sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), conseguenza dell'infezione da HIV-1, è una patologia diffusa a livello mondiale; dalla sua scoperta, nel 1984, ad ora ha causato la morte di milioni di persone, ma, nonostante gli enormi

progressi compiuti in questo campo dalla ricerca, una cura o un vaccino valido non è ancora disponibile (Montagnier, 2010).

In quest'ottica, l'ottenimento di un modello animale adeguato è fondamentale per migliorare la conoscenza di questo patogeno, nonché per il progresso, per la sperimentazione e per la valutazione dell'efficacia *in vivo* di vaccini e di farmaci. Tra i vari modelli disponibili, FIV, e il suo ospite naturale, il gatto domestico, risultano particolarmente idonei. Infatti, nonostante la lontananza dal punto di vista filogenetico con HIV-1, vi è similarità nell'organizzazione genomica, nella struttura morfologica, nelle proprietà biologiche e nella persistenza dell'infezione nell'ospite naturale (Elder *et al.*, 2008). Diversamente da quanto accade nella patologia indotta da SIV nella scimmia, lo sviluppo della malattia nel gatto, da parte di FIV, non richiede trasmissione *cross-specie*, permettendo così di studiare l'infezione sia orizzontalmente che verticalmente (Coats, 2005). Rispetto a SIV ed alla scimmia, FIV, ma soprattutto il gatto domestico, risulta vantaggioso in termini economici, logistici e di gestione degli animali, largamente rappresentati e non in via di estinzione. Un ulteriore aspetto di grande interesse è la specie-specificità di FIV: infatti, nonostante l'uomo condivide con il gatto il principale co-recettore per questo virus, CXCR4 (Willet *et al.*, 1997a,b), non vi sono evidenze di trasmissione di questo patogeno (Mustafa *et al.*, 2005). Questo aspetto rende FIV particolarmente idoneo e sicuro da rischio biologico presentando quindi anche numerosi vantaggi per il suo utilizzo come vettore per la terapia genica nell'uomo. Vettori FIV-basati possiedono infatti la capacità di trasdurre cellule quiescenti con espressione a lungo termine del transgene anche se, rispetto a quelli ottenuti a partire da HIV-1, non risultano patogeni o infettivi per l'uomo (Kang *et al.*, 2005, Saenz and Poeschla, 2004). Infine, FIV è l'unico lentivirus di cui esiste un vaccino disponibile in grado di proteggere il gatto domestico da tutti i sottotipi (Hohdatsu *et al.*, 1997); tale meccanismo di protezione sembra coinvolgere l'immunità sia umorale che innata (Pu *et al.*, 1997).

Il modello FIV e il suo ospite rappresentano quindi degli strumenti utilissimi nella comprensione delle patologie virali in modo da: i) capire perché la risposta immunitaria di lentivirus, quali FIV ed HIV-1, risulta debole se comparata all'immunità contro altri tipi di virus, prerequisito essenziale per un vaccino efficiente; ii) analizzare in maggior dettaglio la patogenesi dell'immunodeficienza, per creare nuove terapie antivirali o di supporto al sistema immunitario in collasso; e infine, iii) chiarire il ruolo di fattori cellulari che collaborano o antagonizzano la diffusione di HIV/FIV. Dato l'enorme potenziale nell'uso del gatto domestico come modello animale per malattie umane, infettive e non, è stato possibile completare il sequenziamento del suo genoma (Progetto

Felis Catus, NCBI). E' interessante notare come dall'analisi sia emerso che il 90% dei geni del gatto domestico risulta essere ortologo al genoma umano (Pontius *et al.*, 2007, Murphy *et al.*, 2007).

Infine, data l'elevata incidenza fra i gatti domestici (Courchamp *and* Pontier, 1994), FIV riveste un ruolo importante nella medicina veterinaria.

3.1.1 Morfologia del virione

Il virione maturo di FIV (Figura 3.1) ha una forma sferica-elissoidale di circa 100-125 nm di diametro. Si possono individuare un involucro esterno (*envelope* o pericapside), dal quale protrudono le glicoproteine virali, e un componente capsidico, costituito da una porzione esterna (matrice) e da una porzione centrale (nucleocapside o *core*), che racchiude il genoma virale e le proteine ad esso associate (Miyazawa *et al.*, 1989, Pedersen *et al.*, 1987).

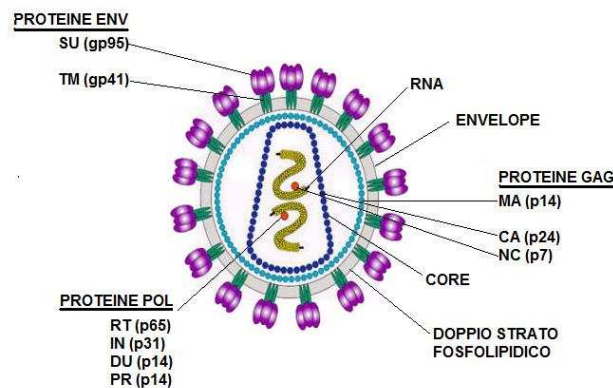


Figura 3.1: Virione di FIV maturo.

L'*envelope*, costituito da un doppio strato fosfolipidico, è acquisito durante la gemmazione dalla membrana plasmatica delle cellule infettate. Sulla superficie del virione sono localizzate le glicoproteine virali di superficie (SU) e transmembrana (TM), codificate dal genoma virale ed associate fra di loro in complessi trimerici mediante legami non covalenti. Esse rivestono un ruolo importante nella biologia di questo virus in quanto determinano il tropismo e l'infettività della particella virale.

Al di sotto dell'*envelope* si distingue la componente capsidica del virione, costituita esternamente dalla matrice ed internamente dal *core* o nucleocapside. Lo strato di matrice è formato dalla proteina matrice (MA), disposto in modo da formare un guscio sferico strettamente associato all'*envelope*, e risulta necessario

per la corretta incorporazione delle proteine virali di superficie nel virione maturo (Manrique *et al.*, 2001).

Il capsido, a simmetria icosaedrica, è costituito da numerose unità della proteina capsidica (CA o p24). Il suo ruolo è quello di racchiudere il genoma e le proteine ad esso associate necessarie per la maturazione e l'infettività del virione. Tra queste sono presenti la proteina nucleocapside (NC) la retrotrascrittasi (RT), l'integrasi (IN), la proteasi (PR) e la deossiridina trifosfatasi (DU), assente nei lentivirus dei primati (Saenz *and* Poeschla, 2004, Luttge *and* Freed, 2010).

3.1.2 Genoma

Il genoma di FIV (Figura 3.2) è diploide, costituito da due filamenti di RNA a polarità positiva geneticamente identici. Esso ha una lunghezza complessiva di circa 9,2 kb e possiede una struttura 7-metilguanosa (CAP) all'estremità 5' ed una coda di poli(A) all'estremità 3'. Le due molecole di RNA sono unite in corrispondenza dei terminali 5' tramite legami a idrogeno che si instaurano a livello di una regione di auto-complementarietà (DLS, *Dimer Linkage Structure*). Il genoma viene incorporato nella particella virale grazie alla presenza del segnale di incapsidazione *Psi* (Ψ), localizzato nella regione 5' di ciascun filamento di RNA. A monte del segnale Ψ , si trova il sito di legame del tRNA cellulare dell'aminoacido lisina (PBS, *Primer Binding Site*), che viene incorporato nel virione, mentre vicino al terminale genomico 3' è presente un corto tratto di polipurine (PPT, *Polypurine Tract*). Entrambi i filamenti del genoma virale presentano alle estremità due corte sequenze ripetute (R) e, adiacenti ad esse, due sequenze uniche U5 e U3, rispettivamente ai terminali 5' e 3'. Da queste due regioni del genoma si formano, durante il processo di retrotrascrizione inversa, le due LTR (*Long Terminal Repeats*) organizzate nella sequenza U3-R-U5, presenti ad entrambe le estremità del genoma provirale (Tang *et al.*, 1999). Le LTR di FIV contengono numerosi siti di legame per una varietà di fattori di trascrizione eucariotici (AP-1, AP-4, NF- κ B, etc.). Sono inoltre presenti un TATA box e un CCAAT box (Sparger *et al.*, 1992, Ikeda *et al.*, 1998). Questi elementi differiscono da quelli caratteristici dell'LTR di HIV-1 sia nel livello di attività trascrizionale basale sia nella loro capacità di rispondere alla transattivazione virale. In FIV infatti, al contrario di HIV-1, il promotore ha un alto livello di attività basale, ma risponde in modo debole ai transattivatori virali (Mustafa *et al.*, 2005). Le sequenze U5 e U3 contengono, inoltre, siti importanti per l'integrazione del provirus nel genoma della cellula ospite (*att sites*).

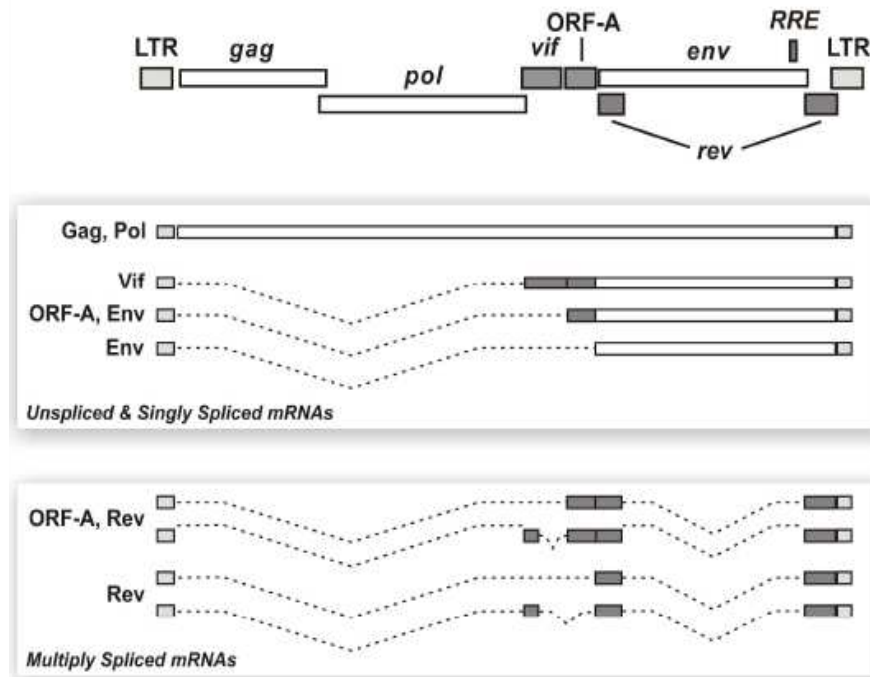


Figura 3.2: Organizzazione del genoma provirale e mappa dei trascritti di FIV (da Pistello, 2008).

Come tutti i retrovirus, il genoma di FIV possiede tre *Open Reading Frames* (ORFs) maggiori, *gag*, *pol* ed *env* (dal 5' al 3'), codificanti le proteine strutturali interne, gli enzimi virali e le proteine dell'*envelope* rispettivamente. Oltre a queste ORF principali, sono presenti altre ORF più piccole, *vif*, *orfA* e *rev*, codificanti proteine a funzione regolatoria (Olmsted *et al.*, 1989, Talbott *et al.*, 1989).

Il trascritto del gene *gag* viene tradotto inizialmente in una poliproteina di 50 kDa. Con l'uscita del virus dalla cellula ospite, la proteina virale proteasi (PR) processa Gag, rispettivamente dall'estremità amminica a quella carbossilica, nelle proteine strutturali matrice (MA), capsidica (CA) e nucleocapsidica (NC) che formeranno il virione maturo di FIV.

Il trascritto del gene *pol* viene tradotto come poliproteina di fusione Gag-Pol di circa 158 kDa mediante un evento di *frameshift* ribosomiale nella regione di sovrapposizione fra le due ORF (Morikawa *and* Bishop, 1992). Durante il *frameshift*, la lettura dei codoni viene spostata in posizione -1 rispetto al *reading frame* di *gag*, al fine di consentire la lettura in fase del gene *pol*. Nel corso dell'assemblaggio della particella virale, la porzione Pol della poliproteina Gag-Pol viene processata, mediante auto-proteolisi, negli enzimi funzionalmente attivi PR, RT, DU e IN.

Il prodotto del gene *env* è una poliproteina di 130 kDa (gp130) che viene processata, grazie all'azione di proteasi residenti nel reticolo endoplasmatico e nel Golgi della cellula ospite, nelle proteine di superficie (SU o gp95) e

transmembrana (TM o gp41). Le proteine dell'*envelope* si collocano a livello della membrana della cellula infettata, in corrispondenza dei siti di assemblaggio delle particelle virali, e sono coinvolte nel tropismo e nell'infettività del virus. La proteina SU è una proteina altamente glicosilata di 95 kDa che favorisce il legame con il recettore cellulare CD134 (Shjmojima *et al.*, 2004). TM, di 41 kDa, è invece una proteina transmembrana che attraversa il doppio strato lipidico dell'*envelope*. Essa contiene il dominio di fusione e quindi è importante per la penetrazione della particella virale nella cellula ospite (Manrique *et al.*, 2004). Entrambe le proteine costituiscono il bersaglio primario degli effettori della risposta immunitaria dell'ospite e la loro sequenza è altamente divergente tra diversi isolati di FIV. Le sostituzioni aminoacidiche sono raggruppate in corrispondenza di regioni variabili delle due glicoproteine, che si alternano a regioni conservate importanti per l'acquisizione della corretta struttura terziaria e del *pattern* di glicosilazione (Bendinelli *et al.*, 1995).

Oltre alle tre ORF appena descritte, FIV ne possiede altre tre, *vif*, *orf-A* e *rev* che codificano le seguenti proteine regolatorie:

- ✓ Vif, detto anche fattore di infettività virale, è coinvolta nell'infettività cellulo-specifica del virus (Tomonaga *and* Mikami, 1996) ed è in grado di contrastare l'azione del fattore di difesa cellulare felino APOBEC3H (Münk *et al.*, 2008, LaRue *et al.*, 2010).
- ✓ Orf-A, detta anche Orf2, svolge molteplici funzioni nel ciclo replicativo di questo virus non ancora completamente chiarite, ma simili a quelle attribuite alle proteine accessorie Vpr, Vpu e Vif di HIV-1 (Gemeniano *et al.*, 2004). ORF-A risulta critica per l'infezione produttiva *in vivo* e *in vitro* in cellule T (Dean *et al.*, 1999, Waters *et al.*, 1996); facilita l'incremento netto in trascrizione/traduzione delle proteine la cui espressione è guidata dalle LTR di FIV con meccanismi distinti da quelli degli altri lentivirus (deParseval *and* Elder, 1999, Chatterji *et al.*, 2002, Waters *et al.*, 1996, Gemeniano *et al.*, 2003). Alcuni studi hanno evidenziato il suo coinvolgimento anche nelle fasi tardive del ciclo replicativo e nell'infettività delle particelle virali (Gemeniano *et al.*, 2003). Essa è in grado inoltre di *down*-regolare l'espressione di geni codificanti enzimi del *pathway* ubiquitina-proteasoma e fattori coinvolti nello *splicing* dell'mRNA, allo scopo di modulare l'ambiente cellulare per permettere la replicazione di FIV (Sundstrom *et al.*, 2008). Recentemente è stato dimostrato come Orf-A induca l'accumulo del recettore primario, CD134, a livello dell'apparato di Golgi, portando ad una riduzione dell'espressione sulla superficie cellulare di CD134 stesso, favorendo così il

rilascio dalle cellule infette, in modo da minimizzare le interazioni tra il recettore e le particelle virali in gemmazione (Hong *et al.*, 2010).

- ✓ Rev, a localizzazione nucleare, è deputata al trasporto degli mRNA virali non processati dal nucleo al citoplasma (Tomonaga and Mikami, 1996) grazie al riconoscimento di una sequenza *Rev Responsive Element* (RRE) presente all'estremità 3' dell'mRNA di interesse (Phillips *et al.*, 1992).

3.1.3 Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo di FIV non è noto nei particolari, ma si ritiene simile a quello di altri lentivirus, ed in particolare a quello di HIV-1 (Figura 3.3).

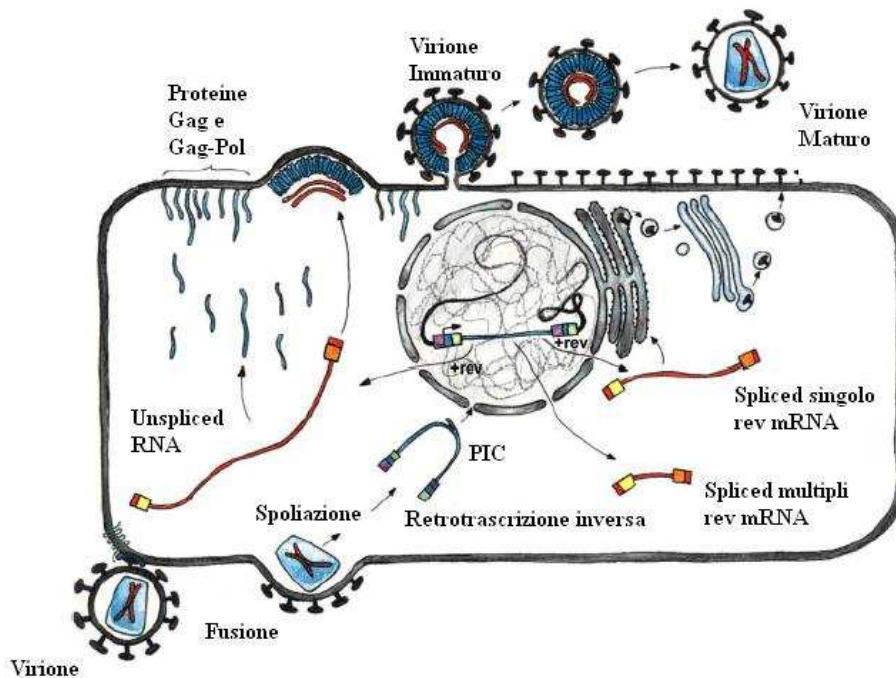


Figura 3.3: Ciclo replicativo di FIV (da Saenz and Poeschla, 2004, modificata).

FIV possiede un tropismo esteso che permette a questo virus di infettare preferenzialmente i linfociti $CD4^+$ T-helper e $CD8^+$, ma anche i linfociti B, i macrofagi e le cellule del sistema nervoso centrale (Elder *et al.*, 2008, Willet and Hosie, 2008).

Il primo evento del ciclo replicativo è rappresentato dall'interazione delle glicoproteine dell'*envelope* con specifiche proteine recettoriali presenti sulla superficie della cellula bersaglio. La glicoproteina SU prende contatto con il recettore CD134 (membro della famiglia dei recettori *tumor necrosis factor/nerve growth factor* TNFR/NGFR) espresso preferenzialmente sulla superficie delle cellule feline T $CD4^+$ (Shimajima *et al.*, 2004, De Parseval *et al.*, 2004), che

rappresentano il bersaglio primario del virus nelle fasi iniziali dell'infezione. Analogamente a quanto avviene nel caso di HIV-1, affinché FIV penetri all'interno della cellula bersaglio, deve inoltre verificarsi il legame di TM con il corecettore CXCR4, principalmente espresso su monociti, linfociti T e B attivati (Willett *et al.*, 2003). Il processo poi prosegue con la fusione della membrana cellulare e dell'*envelope* virale e con l'ingresso del *core* del virione all'interno della cellula.

Dopo l'evento di fusione, l'RNA genomico, associato alle proteine virali, viene liberato nel citoplasma. La retrotrascrittasi inversa contenuta nel virione lo copia in una molecola di DNA a doppio filamento con una LTR a ciascuna estremità (provirus). Il DNA formato si associa ad alcune proteine virali, dando origine al complesso di pre-integrazione (PIC, *preintegration complex*), che viene traslocato nel nucleo e integrato nel genoma dell'ospite, ad opera della proteina virale integrasi. La LTR, localizzata all'estremità 5' del DNA integrato, riconosciuta dalla RNA polimerasi II dell'ospite, regola così l'intera trascrizione del genoma in un unico messaggero *full-length*. Esso funzionerà come genoma che verrà incorporato nella progenie virale, come stampo per la traduzione delle proteine virali oppure processato per originare tutti gli altri trascritti (Figura 3.2). Inizialmente vengono esportati al citoplasma gli mRNA dei geni regolatori sottoposti ad eventi multipli di *splicing* e, solo quando la proteina Rev raggiunge una certa concentrazione, anche i trascritti sottoposti ad eventi singoli di *splicing* e quelli non processati, vengono efficientemente trasportati nel citoplasma e sottoposti a traduzione. L'assemblaggio della particella virale avviene tipicamente a livello della membrana plasmatica e inizia con la formazione del complesso Gag-RNA genomico, mediato dalla regione NC della poliproteina Gag e dal segnale Ψ presente sull'RNA. Il precursore Gag dei retrovirus media il reclutamento delle proteine di superficie dei virioni al sito di assemblaggio, oltre che quello del precursore degli enzimi virali Pol, la poliproteina di fusione Gag-Pol. Le particelle virali assemblate vengono rilasciate per gemmazione dalla membrana della cellula ospite. In concomitanza al rilascio o immediatamente dopo questo evento, le particelle virali vanno incontro a maturazione mediante il processamento proteolitico dei precursori proteici.

Alcune evidenze sperimentali sembrano suggerire che taluni virus dotati di *envelope*, tra i quali HIV-1, si assemblino e gemmino in corrispondenza di microdomini della membrana plasmatica, noti come *lipid rafts*, arricchiti in sfingolipidi e colesterolo. Tuttavia, l'ipotesi che i *lipid rafts* abbiano un ruolo nella gemmazione virale non è universalmente accettata (Morita *and* Sundquist, 2004). Si ritiene che nei macrofagi e in alcuni altri tipi cellulari, HIV e altri

retrovirus possano gemmare anche all'interno della cellula infettata, oltre che a livello della membrana plasmatica. I siti di rilascio interno corrispondono ai *multivesicular bodies*, nei quali i virioni gemmano sottoforma di vescicole intraluminali che vengono successivamente esocitate nell'ambiente extracellulare (Morita *and* Sundquist, 2004).

3.1.4 Patogenesi dell'infezione

FIV è un lentivirus associato ad una sindrome simile all'AIDS nel gatto domestico (Pedersen *et al.*, 1987). Il decorso clinico dell'infezione da FIV nel suo ospite naturale è caratterizzato da una progressiva compromissione del sistema immunitario, con andamento sovrapponibile a quello osservato nell'uomo per HIV-1:

- ✓ Fase acuta: rappresenta il periodo immediatamente successivo al contagio, spesso clinicamente silente o simile ad un'influenza, dove il virus colpisce principalmente i linfociti T CD4-positivi e in minor percentuale i macrofagi. Questi ultimi risultano essere meno sensibili all'effetto citopatico di FIV, fungendo così da serbatoio per la persistenza dell'infezione nell'ospite (Beebe *et al.*, 1994).
- ✓ Fase di latenza: periodo di durata variabile, dove la malattia si presenta asintomatica.
- ✓ Linfadenopatia generalizzata: caratterizzata da segnali clinici non specifici dove però si riscontra l'inversione del rapporto CD4/CD8 dovuto al declino dei linfociti CD4-positivi.
- ✓ Sindrome da immunodeficienza: in questa fase vi è una forte perdita di linfociti CD4-positivi correlato ad un aumento nel plasma del numero di copie di RNA di FIV. A questo livello compaiono numerose infezioni opportunistiche, disordini neurologici e tumori di diversa eziologia che portano rapidamente alla morte dell'animale (Goto *et al.*, 2000).

In seguito all'infezione da FIV, l'ospite reagisce a livello umorale con la produzione di anticorpi neutralizzanti e con un'elevata risposta cellulo-mediata di tipo citotossico (Beatty *et al.*, 1996, Song *et al.*, 1992), che determinano nel complesso un'iniziale riduzione della carica virale nel plasma (Mooij *and* Heeney, 2001, Musey *et al.*, 1997). Anche se tale risposta è significativa e persistente durante il decorso della malattia, non è comunque in grado di arrestarne la progressione né di impedirne l'esito finale.

3.1.5 Le poliproteine Gag e Gag-Pol di FIV

La poliproteina Gag ed i prodotti derivanti dal suo processamento svolgono un ruolo chiave nel ciclo replicativo retrovirale. Infatti, è noto come il precursore sia importante nei processi di assemblaggio e gemmazione, mentre i prodotti di processamento derivati risultano essenziali per l'infettività virale. Come per tutti gli altri retrovirus, la sola poliproteina Gag di FIV è in grado di assemblare e gemmare dalle cellule in assenza di ogni altro fattore virale (Göttlinger *et al.*, 1991). Tale evento porta al rilascio di particelle simil-virali (VLPs, *Virus-Like Particles*) immature e non infettive. A tale scopo, tutte le proteine Gag retrovirali, contengono domini necessari per: i) l'indirizzamento alla membrana plasmatica; ii) le interazioni Gag-Gag; iii) l'incapsidazione selettiva dell'RNA genomico virale (Darlix *et al.*, 1995) e, infine, iv) per il rilascio virale, cooperando con cofattori cellulari dell'ospite in modo da dirottarli per completare la formazione e il rilascio di particelle infettive dalla cellula ospite (Göttlinger *et al.*, 1991, Morita and Sundquist, 2004).

Il precursore Gag viene prodotto durante le fasi tardive della replicazione virale e dà origine ad un RNA messaggero che viene tradotto, nei polisomi liberi del citoplasma della cellula ospite, in una proteina del peso di 50 kDa (Pr50^{Gag}) (Egberink *et al.*, 1990, Steinman *et al.*, 1990). Le proteine Gag dei retrovirus contengono tre regioni conservate che svolgono funzioni distinte durante l'assemblaggio virale:

- ✓ dominio matrice (MA): localizzato all'estremità aminoterminale, ha il compito di dirigere la poliproteina Gag alla membrana plasmatica della cellula ospite, di mediarne l'associazione ad essa e di reclutare le glicoproteine dell'*envelope* nei virioni. La capacità di indirizzare Gag alla membrana plasmatica è promossa dalla presenza dei residui basici in MA ed è resa possibile dalla modificazione covalente cotraduzionale dell'estremità aminoterminale mediante addizione dell'acido miristico. Il reclutamento delle proteine dell'*envelope* sembra essere mediato da interazioni tra la coda citoplasmatica di Env e la regione aminoterminale della matrice (Luttge and Freed, 2010).
- ✓ Dominio capsidico (CA): in posizione centrale nel precursore Gag, riveste un ruolo importante nel promuovere le interazioni Gag-Gag durante l'assemblaggio. Inoltre, CA risulta essere il prerequisito essenziale per la formazione dell'involucro esterno che protegge il *core* virale, dove si trovano l'RNA genomico e le proteine ad esso associate (Luttge and Freed, 2010). Alcune evidenze sperimentali suggeriscono come CA sia

coinvolto nelle interazioni tra Gag e le componenti del citoscheletro della cellula ospite, al fine di promuovere il trasporto anterogrado degli intermedi di assemblaggio virale alla membrana plasmatica (Luttge *and* Freed, 2010).

- ✓ Dominio nucleocapside (NC): presente all'estremità carbossiterminale della poliproteina Gag di FIV possiede, in analogia con quelli di tutti gli altri retrovirus, un elevato contenuto di residui basici e, ad eccezione degli spumavirus, contiene due copie del un motivo legante zinco (*zinc-finger motif*) con la sequenza conservata Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys. Esiste un elevato e inusuale grado di omologia di sequenza nella regione degli *zinc-fingers* tra tutti i lentivirus e, in particolare, il numero di aminoacidi che separa i residui di cisteina e di istidina che coordinano gli atomi di zinco è identico tra i nucleocapsidi di FIV, HIV-1 ed EIAV, con una sola minima differenza nella regione spaziatrice tra i due *zinc-fingers* nel nucleocapside di HIV-1 (Luttge *and* Freed, 2010). L'evidenza che ci sia un elevato livello di conservazione può essere spiegata dal fatto che questo dominio del NC risulta critico durante la replicazione retrovirale in quanto è coinvolto in molteplici aspetti: i) insieme a CA, media le interazioni Gag-Gag durante l'assemblaggio; ii) grazie ai motivi *zinc-fingers*, permette la selettiva incorporazione del genoma nei virioni, mediante il riconoscimento del segnale di *packaging* Ψ sull'RNA virale; e iii) ha un ruolo nelle fasi tardive del ciclo replicativo virale di HIV-1 e, in particolare, negli eventi di gemmazione e di rilascio dei virioni dalla membrana plasmatica della cellula ospite come recentemente dimostrato (Popov *et al.*, 2008, Dussupt *et al.*, 2009).
- ✓ Peptide p2: situato all'estremità carbossiterminale del precursore Gag di FIV, corrisponde al peptide p6 di HIV-1 ed è essenziale per il rilascio dei virioni assemblati dalle cellule infettate mediante l'interazione con fattori dell'ospite (Calistri *et al.*, 2009b). p2, come il peptide p6 di HIV-1, non sembra avere alcun ruolo strutturale nei virioni maturi di FIV.

In aggiunta a queste regioni conservate, in modo analogo ad HIV-1, il precursore Gag di FIV contiene due regioni spaziatrici, denominate SP1 e SP2, fiancheggianti il NC (Luttge *and* Freed, 2010).

In seguito all'assemblaggio ed al rilascio virale, il precursore Gag viene processato da parte dall'enzima virale proteasi (PR) nelle proteine strutturali interne al virione maturo: matrice di 14,5 kDa (MA, p14), importante per la morfogenesi e l'infettività delle particelle virali (Manrique *et al.*, 2001); capsidi di 24,5 kDa (CA, p24), che forma l'involucro proteico del *core* del virione; e

nucleocapside di 7 kDa (NC, p7), strettamente associato all'RNA genomico in un complesso ribonucleoproteico. La proteina NC in particolare gioca un ruolo chiave nel ciclo replicativo dei retrovirus. Infatti, oltre alle proprietà precedentemente menzionate, essa è implicata: nella fase di retrotrascrizione, con probabile funzione di protezione degli acidi nucleici virali da parte di endonucleasi cellulari; nella fase di trasporto del PIC al nucleo e nella fase di integrazione. NC funge inoltre da *chaperone* molecolare per gli acidi nucleici virali (Thomas *and* Gorelick, 2008, Luttge *and* Freed, 2010) e infine promuove l'appaiamento del tRNA cellulare con il PBS del genoma virale (Manrique *et al.*, 2004).

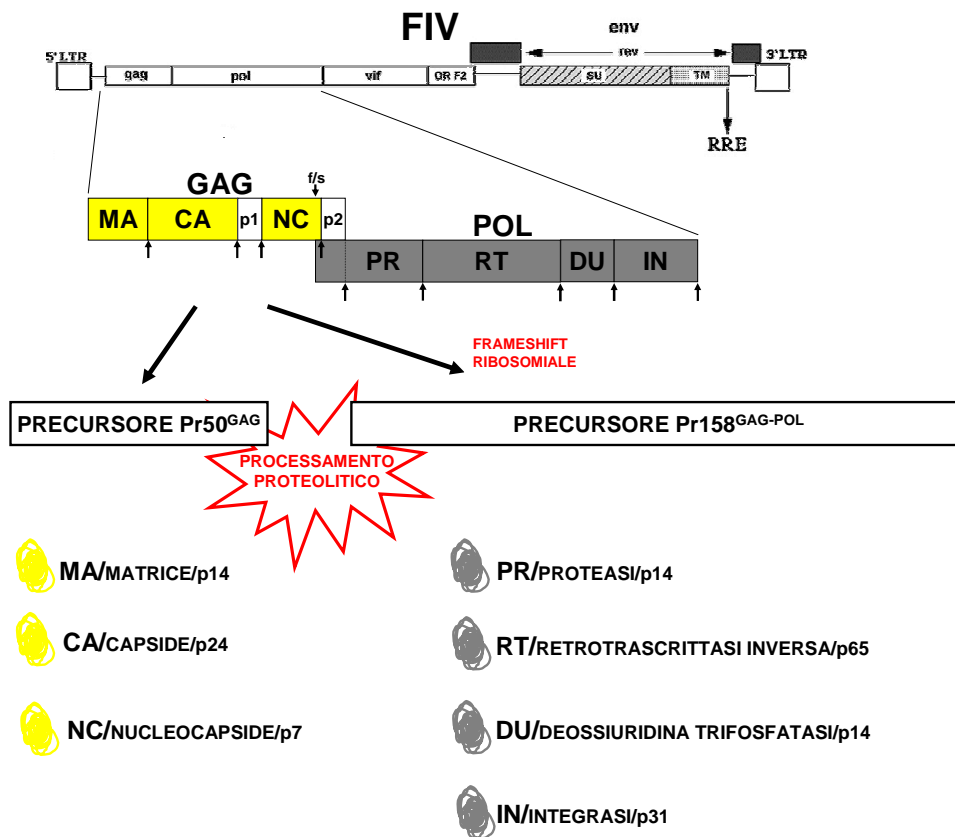


Figura 3.4: Rappresentazione schematica del processamento e maturazione della poliproteina Gag-Pol (Freed *et al.*, 2008, modificata).

Il precursore Gag-Pol di FIV viene tradotto nei polisomi liberi del citoplasma della cellula ospite come poliproteina di fusione di 158 kDa ($\text{Pr158}^{\text{GagPol}}$), in seguito ad un evento di *frameshift* ribosomiale a partire dallo stesso messaggero che funge da stampo al precursore Gag. La frequenza di tale evento è del 30%, determinando così un rapporto nella produzione di Gag e Gag-Pol pari a 20:1. Il motivo consenso che guida il *frameshift* è localizzato nella regione corrispondente

a quella sovrapposta fra i geni *gag* e *pol* (GGGAAAC) ed è fiancheggiato da una sequenza organizzata in una particolare struttura terziaria (Morikawa *and* Bishop, 1992). La poliproteina Gag-Pol viene incorporata nelle particelle in via di formazione in virtù di interazioni intermolecolari con Gag. Nella fase di maturazione in seguito al rilascio del virione, anch' essa viene processata proteoliticamente da parte di PR, dando origine agli enzimi virali PR, RT, DU e IN (rispettivamente dall'estremità amminica a quella carbossilica) (Figura 3.4). La proteasi di FIV è una proteina di 14 kDa, funzionale come omodimero e responsabile del processamento delle poliproteine Gag e Gag-Pol nelle loro forme mature. Diversamente da HIV-1, la sequenza codificante la proteasi di FIV nel gene *pol* è esclusa dalla regione di sovrapposizione con l'ORF di *gag* (Lin *et al.*, 2003). La retrotrascrittasi è una proteina eterodimerica costituita da due polipeptidi di 66 kDa e di 51 kDa con attività di DNA polimerasi DNA- o RNA-dipendente e di RNasiH. Tale enzima media la retrotrascrizione del genoma virale ad RNA in DNA a doppio filamento. Non essendo dotata di attività di *proof-reading* (attività esonucleasica in direzione 3'-5'), la RT di FIV, analogamente all'enzima di HIV-1, è una polimerasi altamente prona ad errori, meccanismo alla base della elevata variabilità genomica di questi virus (Amacker *et al.*, 1995). L'enzima deossiridina trifosfatasi (dUTPasi, DU) è costituito da tre subunità di 14,3 kDa ciascuna ed è presente nei lentivirus che infettano i non primati, quali FIV ed EIAV. La sua attività consiste nell'idrolisi del nucleotide dUTP in dUMP, al fine di prevenire la sua scorretta incorporazione durante la sintesi del DNA provirale. Questa funzione potrebbe essere di particolare importanza per la replicazione virale in tipi cellulari che hanno bassi livelli intrinseci di attività dUTPasica, come i macrofagi non ciclianti (Bendinelli *et al.*, 1995). L'integrasi è una proteina di 32 kDa, attiva in forma multimerica, che catalizza l'integrazione del DNA provirale nel genoma della cellula ospite (Vink *et al.*, 1994).

La concentrazione delle proteine virali in corrispondenza di determinati siti della membrana cellulare dell'ospite, le loro interazioni reciproche e con specifici fattori cellulari, nonché, probabilmente, la composizione lipidica della membrana in cui avviene l'assemblaggio, inducono la curvatura della stessa e la conseguente formazione di particelle virali sferiche provviste di *envelope* che gemmano dalla cellula ospite (Morita *and* Sundquist, 2004).

Nelle fasi tardive del ciclo infettivo di FIV le molecole di Gag non processate si assemblano al di sotto della membrana plasmatica, quindi le particelle virali immature provviste di *envelope* gemmano dalla cellula ospite. Successivamente, la poliproteina precursore Gag-Pol viene processata dalla proteasi virale codificata dalla regione *pol*, senza la collaborazione di altre proteasi di origine cellulare.

Questi tagli proteolitici sono responsabili del processamento delle poliproteine Gag e Gag-Pol nelle dieci proteine individuali e funzionali di FIV (Elder *et al.*, 1993). La proteasi di FIV è attiva solo come omodimero, per questo due precursori Gag-Pol devono dimerizzare anch'essi durante il processo di assemblaggio del virus, in modo tale che i loro domini proteasici possano diventare attivi e permettere, così, il processamento del precursore. La proteina PR è anche in grado di regolare la propria attività mediante auto-proteolisi su quattro siti all'interno della proteasi stessa (Laco *et al.*, 1997).

Il processamento delle poliproteine Gag e Gag-Pol è un processo finemente regolato della proteasi stessa e questo risulta critico per la maturazione, per l'infezione e per la replicazione del virus in nuove cellule bersaglio (Swanstrom *and Willis*, 1997, Petitt *et al.*, 1998). Infatti, una volta che il virione gemma dalla membrana della cellula ospite, si assiste ad un riarrangiamento strutturale che porta alla maturazione dello stesso, nel quale NC si condensa assieme all'RNA genomico in un complesso all'interno del virione, CA si assembla assumendo la forma conica del capsido che circonda il complesso NC-RNA, mentre MA rimane associata all'envelope virale.

3.2 I late domains nella gemmazione dei virus dotati di envelope

La maggior parte dei retrovirus assembla e gemma attraverso una serie di fasi distinte, in cui la poliproteina Gag appena tradotta viene prima indirizzata alla membrana nel sito di assemblaggio, in seguito la distorce in modo da formare particelle semisferiche che vengono rilasciate mediante un processo di strozzatura della membrana, permettendo così a questi virus dotati di *envelope* di acquisire il pericapside (Morita *and Sundquist*, 2004). La complessità di questo processo e la limitata informazione genetica presente in questi virus ha fatto sì che questi patogeni intracellulari si siano evoluti per sfruttare e dirottare a loro favore macchinari cellulari conservati per il rilascio delle particelle dalle cellule infettate. Infatti, a riprova di ciò, la sola proteina strutturale Gag è in grado di guidare l'assemblaggio e la gemmazione di particelle simil-virali non infettive dalla cellula, in assenza di qualunque altro fattore virale (Göttlinger *et al.*, 1991).

Studi di delezione e di mutagenesi della regione carbossiterminale p6 della proteina Gag di HIV-1 hanno portato all'identificazione di corti motivi aminoacidici richiesti per l'efficiente rilascio delle particelle virali. Queste sequenze sono state chiamate domini tardivi (*Late domains*, *L-domains* o domini L) poiché, mutazioni in tale contesto inducono un blocco nelle fasi tardive del ciclo replicativo. Le particelle virali, pur assemblandosi in virioni relativamente

normali, non si separano in modo efficiente dalla membrana plasmatica, accumulandosi sulla superficie cellulare (Göttlinger *et al.*, 1991).

Questi e altri studi analoghi hanno permesso di definire che i domini tardivi sono: i) di tre tipi; ii) caratterizzati da un motivo aminoacidico altamente conservato ricco in prolina; iii) moduli autonomi la cui funzione è spesso posizione-indipendente all'interno della proteina strutturale; iv) interscambiabili, in alcuni casi, tra virus non filogeneticamente correlati tra loro; e infine, iv) presenti nelle proteine strutturali di virus ad RNA a polarità positiva e negativa dotati di *envelope* (Figura 3.5) (Strack *et al.*, 2002, Morita *and* Sundquist, 2004).

Finora sono state caratterizzate tre classi principali di domini tardivi:

- ✓ P(T/S)AP: il motivo PTAP identificato nel dominio p6, all'estremità C-terminale del precursore Gag di HIV-1 (Göttlinger *et al.*, 1991), rappresenta il primo dominio L caratterizzato.
- ✓ PPxY: è stato inizialmente evidenziato nella proteina Gag del Virus del Sarcoma di Rous (RSV), tra i domini MA e CA (Parent *et al.*, 1995). PPxY rappresenta il *late domain* caratteristico degli oncoretrovirus, nei quali si localizza tipicamente nella regione aminoterminale di Gag (Strack *et al.*, 2002). La sequenza riveste il ruolo di dominio tardivo anche in altri retrovirus, in rhabdovirus, filovirus e arenavirus (Morita *and* Sundquist, 2004).
- ✓ YP(x)nL: il motivo YPDL è stato identificato all'estremità carbossiterminale del precursore Gag di EIAV (Puffer *et al.*, 1997). In seguito, la sequenza correlata YPLTSL è stata individuata all'estremità carbossiterminale di p6 di HIV-1 (Strack *et al.*, 2003).

Un nuovo putativo *late domain* con sequenza FPIV è stato identificato nelle proteine strutturali di orto- e paramyxovirus (Hui *et al.*, 2003).

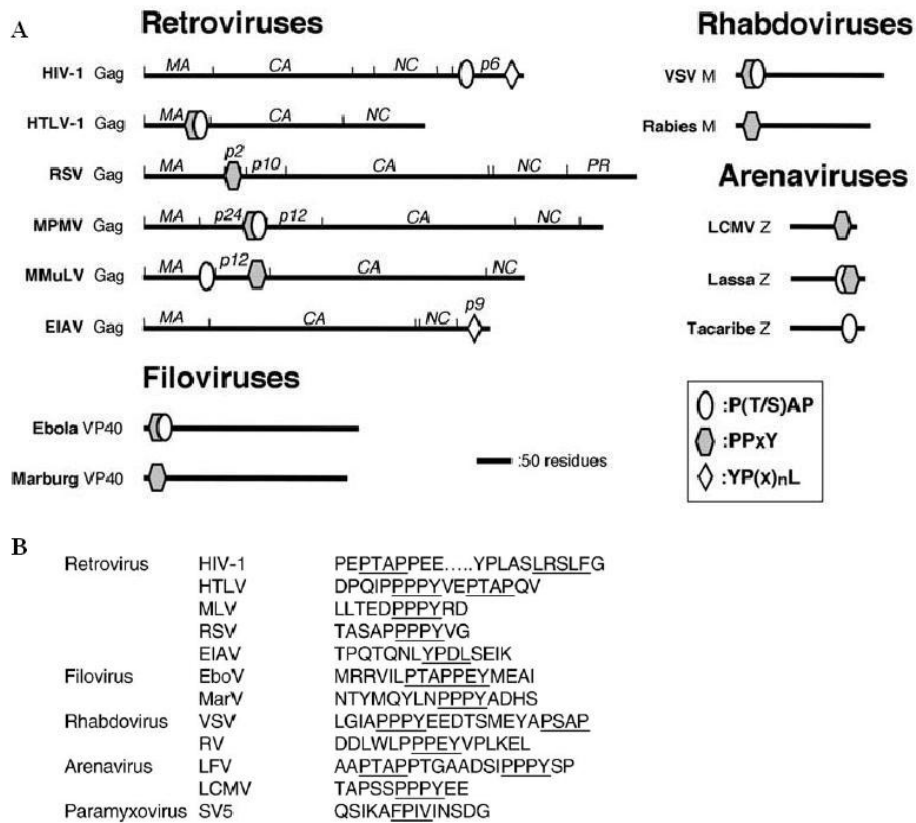


Figura 3.5: L Domain : **A**) organizzazione dei domini e motivi (da Bieniasz, 2006) e **B**) sequenza aminoacidica (da Morita *and* Sundquist, 2004).

L'impiego diffuso di domini tardivi comuni tra diverse famiglie di virus ad RNA dotati di *envelope* è rilevante in quanto fa supporre l'utilizzo di meccanismi di gemmazione conservati e comuni (Morita *and* Sundquist, 2004).

Queste evidenze sperimentali hanno suggerito che gli *L-domains* possano funzionare come siti di attacco per specifiche proteine cellulari necessarie per il rilascio del virus dalla cellula ospite (Calistri *et al.*, 2009b). A sostegno di questa ipotesi, vi è l'evidenza che i domini L virali siano in grado di mimare analoghi motivi aminoacidici presenti in proteine cellulari facenti parte del *pathway* di biogenesi dell'organello noto come *multivesicular body* (MVB).

3.3 I *multivesicular bodies*

I *multivesicular bodies* sono organelli intracellulari circondati da una membrana che delimita diverse vescicole intraluminali (ILVs, *intraluminal vesicles*). Nelle cellule eucariotiche i MVB rivestono un ruolo essenziale in quanto mediano la degradazione di proteine integrali di membrana (Figura 3.6). Infatti, dopo la genesi, i *multivesicular body* si fondono in un successivo momento con i lisosomi

dove la membrana delle ILV viene degradata dalle lipasi e dalle idrolasi ed il suo contenuto processato dalle proteasi lisosomiali (Calistri *et al.*, 2009b). L'immissione in questo *pathway* è permesso mediante l'ubiquitinazione delle proteine bersaglio, in particolare nella forma di monoubiquitinazione o attraverso corte catene di poliubiquitinazione, in cui i singoli monomeri di ubiquitina sono uniti tramite il residuo di lisina 63. L'ubiquitinazione del cargo inizia, spesso, a livello della membrana plasmatica e continua negli endosomi (Raiborg *and* Stenmark, 2009).

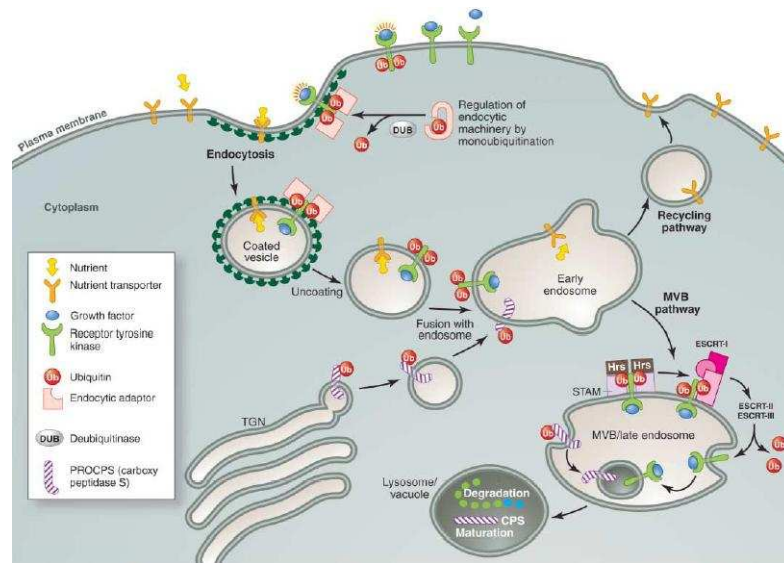


Figura 3.6: Pathway secretorio/endocitico (da Mukhopadyay *and* Riezman, 2007).

La formazione delle vescicole intraluminali rappresenta un passaggio chiave per la biogenesi ed il funzionamento di questo organello. Tale processo avviene grazie al sequenziale reclutamento di diverse proteine citoplasmatiche note come proteine Vps (*Vacuolar protein-sorting*) di classe E. Studi in lievito hanno dimostrato come mutazioni a carico di esse inibiscano il *sorting* delle proteine al vacuolo, bloccando così la formazione dei MVB e causando l'accumulo di compartimenti endosomiali deformati e multilamellari, noti come compartimenti di classe E. Per ogni proteina di lievito di classe E esiste almeno un ortologo umano, a dimostrazione dell'elevato grado di conservazione del *pathway* dei MVB nel corso dell'evoluzione (Morita *and* Sundquist, 2004). La maggior parte delle proteine di classe E partecipa alla formazione di quattro complessi eteromerici solubili denominati ESCRT (*Endosomal sorting complex required for transport*), che vengono reclutati sequenzialmente al sito di biogenesi dei MVB (Figura 3.7) e sono responsabili: i) del riconoscimento delle proteine bersaglio sulla membrana

degli endosomi; ii) della deformazione della stessa per consentire al cargo di essere indirizzato alle invaginazioni intraluminari e iii) della scissione della membrana che porta alla generazione delle ILV (Raiborg *and* Stenmark, 2009).

Il primo complesso, noto come ESCRT-0 o HRS, è composto dalle subunità proteiche HRS (*Hepatocyte growth factor Receptor tyrosine kinase Substrate*) e STAM ed ha il ruolo chiave di riconoscere le proteine ubiquitinate (Raiborg *and* Stenmark, 2009). ESCRT-0 ha la capacità inoltre di localizzarsi sulla sede di biogenesi dei MVB grazie all'interazione tra la subunità HRS e il fosfatidilinositolo 3-fosfato [PI(3)P], lipide ampiamente presente a livello degli endosomi precoci (Raiborg *et al.*, 2001). Il complesso successivo, ESCRT-I, viene reclutato mediante l'interazione tra il motivo PSAP di HRS del complesso ESCRT-0 e TSG101 (*Tumor Susceptibility Gene 101*), iniziando così la cascata di eventi che porta all'assemblaggio di tutte le proteine VPS richieste per la formazione dei MVB. Oltre a TSG101, fanno parte di ESCRT-I anche VPS28, VPS37 e Mvb12 (Raiborg *and* Stenmark, 2009). In particolare ESCRT-I/TSG101 sono in grado di legare le proteine cargo ubiquitinate destinate alle vescicole dei MVB (Bishop *and* Woodman, 2001). In successione, viene reclutato ESCRT-II, composto da Vps36, Vps22 e Vps25. Tale complesso è in grado di interagire con TSG101/ESCRT-I mediante Vps36; tuttavia può localizzare a livello della membrana degli endosomi anche in assenza di ESCRT-I, in virtù di ulteriori putativi segnali di reclutamento (Babst *et al.*, 2002). Le proteine bersaglio ubiquitinate passano quindi sequenzialmente attraverso i complessi ESCRT e vengono, infine, indirizzate alle ILV in formazione con l'aiuto del complesso ESCRT-III e dei fattori ad esso associati (Calistri *et al.*, 2009b). ESCRT-III rappresenta il complesso finale reclutato a livello della membrana endosomale e sembra essere il *core* dell'apparato che guida la deformazione e la scissione della stessa nelle vescicole dei MVB. Nelle cellule di mammifero è costituito dalle proteine CHMP (*Chromatin modifying proteins, Charged multivesicular body proteins*), strutturalmente relazionate e caratterizzate dall'estremità aminoterminale basica e da quella carbossiterminale acida.

Un'altra proteina di classe E coinvolta nelle fasi finali del *pathway* dei MVB è AIP1/Alix (*Apoptosis-linked gene 2 (ALG-2)-interacting protein x*), che è in grado di interagire con TSG101 attraverso il motivo PTAP e con CHMP4 mediante il dominio aminoterminale Bro1, creando una connessione tra i complessi ESCRT-I ed ESCRT-III (Strack *et al.*, 2003, Calistri *et al.*, 2009b).

Al termine di ogni ciclo di formazione dei MVB, il complesso ESCRT-III interagisce con l'enzima AAA (*ATPasi associated with various cellular activities*) ATPasi Vps4, proteina di classe E, che ha il ruolo di disassemblare e rendere di

nuovo disponibili i complessi ESCRT, permettendo così l'avvio di un nuovo ciclo (Babst *et al.*, 2002, Babst, 2005).

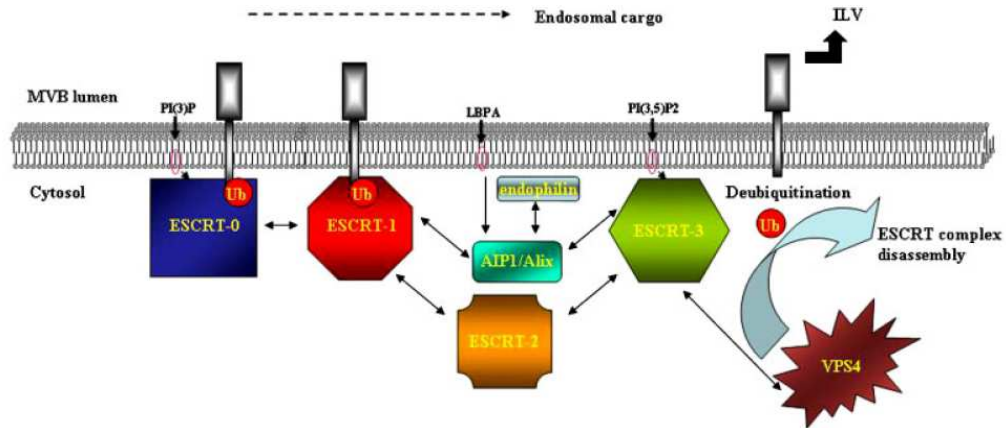


Figura 3.7: Modello schematico del *sorting* delle proteine ubiquitinate attraverso il *pathway* dei MVB (da Calistri *et al.*, 2009b).

Studi condotti in quest'ultimo decennio hanno dimostrato che la gemmazione dei virus dotati di *envelope* risulta essere un processo topologicamente identico alla biogenesi dei MVB, poiché in entrambi i casi si assiste all'invaginazione della membrana lontano dal citoplasma e alla successiva formazione di vescicole di contenuto citoplasmatico (Piper *and* Katzmann, 2007). Ciò spiega perché, nel corso dell'evoluzione, i virus hanno acquisito la capacità di sfruttare il *pathway* per la gemmazione e, in particolare, per la fase cruciale della separazione del virione dalla membrana cellulare. La gemmazione dei virus dotati di domini tardivi esibisce una significativa sensibilità a versioni mutanti di Vps4 o di componenti del complesso ESCRT-III (Strack *et al.*, 2003, Calistri *et al.*, 2009b). E' noto, da numerosi studi indipendenti, che i virus hanno evoluto almeno due diversi meccanismi per sfruttare il macchinario di biogenesi dei MVB a loro favore. Il primo, ancora decisamente controverso, coinvolge l'ubiquitinazione di specifici componenti virali (Morita *and* Sundquist, 2004). L'ubiquitinazione è una modificazione post-traduzionale reversibile che gioca un ruolo primario nella regolazione di molteplici meccanismi intracellulari, tra cui la divisione cellulare, la differenziazione, la trasduzione del segnale, il *trafficking* intracellulare delle proteine, la degradazione al proteasoma, l'endocitosi e il controllo della qualità del DNA (Haglund *and* Dikic, 2005). L'ubiquitina è una proteina di 76 aminoacidi altamente conservata presente in tutte le cellule. Tale molecola si lega covalentemente ai residui di lisina (Lys) delle proteine bersaglio. L'Ub stessa contiene 7 residui di Lys (Lys6, Lys11, Lys 27, Lys29, Lys33, Lys48 e Lys63)

tutti potenzialmente coinvolti nel processo di ubiquitinazione (Haglund *and* Dikic, 2005). Esistono diverse forme di ubiquitinazione: la monoubiquitinazione è il legame di una singola molecola di Ub alla proteina, la multiubiquitinazione avviene quando singole molecole di Ub sono legate a diversi residui di Lys della proteina bersaglio, la poliubiquitinazione consiste nell'interazione tra il target proteico e una catena di Ub (Mukhopadhyay *and* Riezman, 2007). Nel caso della poliubiquitinazione possono esserci almeno sette tipi di legame tra le ubiquitine, in base al residuo di Lys coinvolto. Il legame attraverso la Lys48 (UbK48) marca le proteine per la degradazione al proteasoma, mentre la monoubiquitinazione e la poliubiquitinazione tramite il residuo in posizione 63 (UbK63) sembrano avere un ruolo importante nel *pathway* dell'endocitosi e nell'indirizzamento delle proteine target al MVB (Mukhopadhyay *and* Riezman, 2007). Il coinvolgimento dell'ubiquitinazione nella fase di gemmazione dei virus dotati di *envelope* è suggerito dal fatto che i) le particelle retrovirali di RSV contengano circa 100 molecole di ubiquitina libera per virione e quantità simili sono state ritrovate in HIV-1, in SIV e in MLV; ii) una parte (circa il 30%) dell'ubiquitina associata ai virioni è coniugata alla poliproteina Gag (Patnaik *et al.*, 2000) e iii) l'inibizione del proteasoma blocca il rilascio di HIV-1 e di altri retrovirus, probabilmente perché viene alterato il *turnover* dell'Ub (Schubert *et al.*, 2000). Il secondo meccanismo con cui i virus sfruttano il *pathway* dei MVB, ben noto ormai, prevede invece la diretta interazione dei componenti ESCRT con i domini tardivi presenti a livello delle proteine strutturali virali. In questo contesto, la maggior parte delle informazioni sulla relazione tra la gemmazione dei retrovirus e le proteine appartenenti ai complessi ESCRT, sono state ottenute a partire da studi di doppio ibrido in lievito. In particolare, per ogni dominio tardivo è stato identificato il relativo *partner* all'interno del *pathway* dei MVB (Figura 3.8).

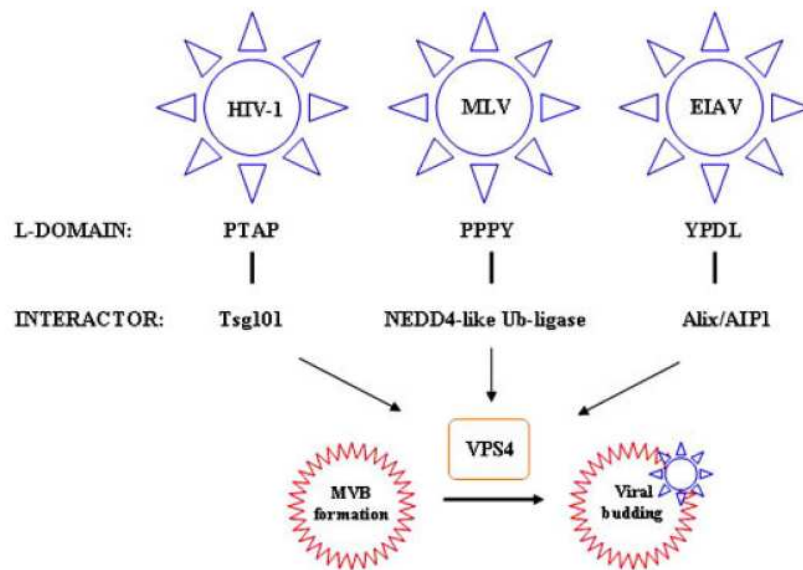


Figura 3.8: Rappresentazione schematica delle interazioni fra i principali *late domain* e specifici fattori cellulari coinvolti nel *pathway* dei MVB (da Calistri *et al.*, 2009b).

Infatti, il primo *late domain* ad essere caratterizzato P(T/S)AP funziona reclutando la proteina TSG101, facente parte del complesso ESCRT-I, mimando la sequenza PSAP omologa presente in HRS (Martin-Serrano *et al.*, 2001, Garrus *et al.*, 2001). Il *late domain* PPxY invece, rappresenta la sequenza consenso per l'interazione con i domini WW, presenti in multiple copie negli enzimi HECT (*Homologous to E6AP C-terminus*) E3 ubiquitin-ligasi, in particolare, reclutando membri della famiglia delle Nedd-4 (*Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4*) ubiquitin-ligasi. L'attività ubiquitin-ligasica di questi enzimi può promuovere il rilascio delle particelle virali attraverso il *pathway* dei MVB, tuttavia il meccanismo attraverso il quale ciò si realizza rimane poco chiaro (Morita and Sundquist, 2004, Bieniasz, 2006). Nonostante l'ubiquitinazione della proteina Gag contenente il motivo PPxY sia collegata direttamente alla capacità di tale dominio di interagire con le ubiquitino ligasi (Harty *et al.*, 2000, Martin-Serrano *et al.*, 2004), è stato dimostrato come una isoforma nativa di Nedd4-2, Nedd4-2s, rappresenti un nuovo meccanismo attraverso il quale i lentivirus dei primati umani (Chung *et al.*, 2008, Usami *et al.*, 2008) e dei non primati (Calistri *et al.*, 2009a) possono mettersi in relazione con il macchinario di gemmazione cellulare anche non possedendo gli elementi chiave per sfruttarlo, poiché privi di tale motivo aminoacidico all'interno della loro proteina strutturale Gag. Tuttavia questi studi suggeriscono come i) l'ubiquitinazione di Gag possa facilitare l'interazione con le proteine leganti ubiquitina appartenenti al MVB *pathway* e ii) l'ubiquitinazione di particolari fattori appartenenti ai MVB possa influenzare la loro capacità di reclutare Gag

(Chung *et al.*, 2008, Usami *et al.*, 2008). Infine, il dominio tardivo YP(X)_nL, inizialmente proposto quale *partner* di legame del complesso adattatore AP-2 (Puffer *et al.*, 1998), promuove la gemmazione virale attraverso l'interazione con la proteina AIP1/Alix, che collega i complessi ESCRT-I e ESCRT-III nel *pathway* dei MVB (Strack *et al.*, 2003).

3.3.1 Ruolo e caratteristiche della proteina AIP1/Alix

AIP1, o Alix, è una proteina citosolica delle cellule di mammifero coinvolta in numerosi processi che spaziano dalla endocitosi al *sorting* delle proteine ma anche all'apoptosi e alla citochinesi in virtù della sua struttura modulare e alla sua capacità di interagire con molti *partner* molecolari. Inoltre, recentemente, questa proteina è stata ampiamente studiata a causa del suo coinvolgimento nelle fasi finali di gemmazione di retrovirus dotati di *envelope*, in particolare di HIV-1 (Fujii *et al.*, 2007, Carlton *et al.*, 2008).

La proteina Alix è costituita da tre maggiori regioni, con funzioni strettamente interconnesse (Figura 3.9):

- ✓ il dominio Bro1 (residui 1-359), localizzato nella regione aminotermine della proteina, ha una forma leggermente ricurva. Tale peculiarità si pensa sia necessaria negli eventi che portano alla generazione della curvatura della membrana durante la formazione dei MVB e, in particolare, nella gemmazione virale. Questo modulo, inoltre, contiene siti di legame conservati per la subunità CHMP4 del complesso ESCRT-III e per la tirosin-chinasi Src.
- ✓ Il dominio V (residui 360-702), posizionato centralmente nella proteina, possiede due braccia di lunghezza variabile che si conformano spazialmente a forma di lettera "V", da cui deriva il nome. Il dominio V contiene il sito di legame per il dominio tardivo YP(X)_nL, in corrispondenza di una tasca idrofobica del braccio maggiore. Il braccio minore, invece, funge da connessione con il dominio Bro1. Questa struttura flessibile del dominio V di Alix potrebbe inoltre essere coinvolta nell'interazione intramolecolare diretta delle regioni Bro1 e del dominio carbossiterminale PRD (*Proline rich domain*), con possibile funzione di autoregolazione della proteina.
- ✓ Il dominio carbossiterminale ricco in prolina, PRD (residui 703-868) è l'ultimo modulo di Alix. Tale regione risulta non essere strutturata ed è in grado di interagire con la maggior parte delle proteine che connettono Alix ai diversi processi cellulari: i) attraverso il legame del motivo PTAP

di TSG101, permette la connessione di Alix con il complesso ESCRT-I dei MVB; ii) via interazione con CIN85, regola in modo negativo l'endocitosi dei recettori attivati dei fattori di crescita; iii) legando le endofiline, partecipa nella curvatura della membrana e infine iv) contattando ALG-2, viene collegata al *pathway* proapoptotico (Strack *et al.*, 2003, Odorizzi, 2006, Fujii *et al.*, 2007).

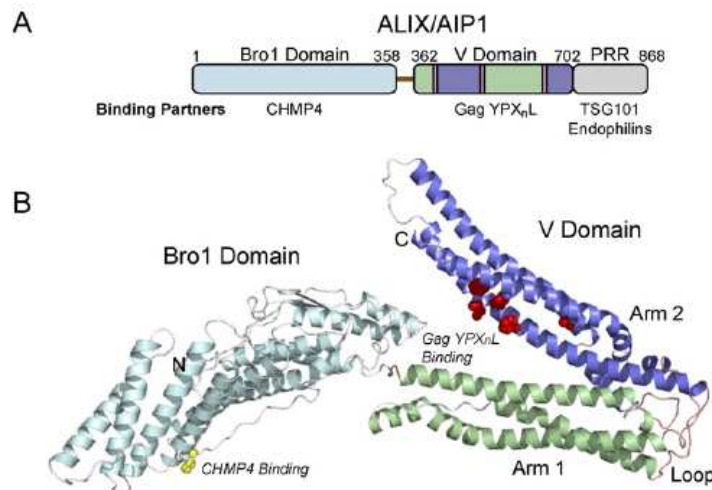


Figura 3.9: Struttura di AIP1/Alix: **A)** rappresentazione schematica dei domini e dei *partner* cellulari di legame; **B)** struttura tridimensionale della proteina (da Fisher *et al.*, 2007).

Alcuni virus dotati di *envelope* utilizzano la proteina AIP1/Alix per accedere al *pathway* dei MVB in modo da sfruttarlo a loro favore per il processo di gemmazione. In particolare, la connessione con AIP1/Alix è permessa dal dominio tardivo YP(X)_nL (Strack *et al.*, 2003, Morita and Sundquist, 2004). Il *late domain* meglio caratterizzato è quello localizzato nella proteina Gag di EIAV, con sequenza YPDL, che rende questo virus strettamente dipendente dalla funzionalità di AIP1/Alix per la promozione del rilascio virale (Strack *et al.*, 2003). In HIV-1 inoltre, nella regione carbossiterminale di p6 Gag, vi è una sequenza analoga, YPLTSL, che risulta essere in grado di legare AIP1/Alix, anche se l'assenza di questa interazione comporta solo un moderato difetto nella gemmazione di questo virus. Si ritiene, pertanto, che il rilascio di HIV-1 dalla cellula sia strettamente dipendente dalla funzionalità del dominio tardivo principale, PTAP, e che il YPLTSL, in grado di legare AIP1/ALIX, costituisca solamente un *late domain* ausiliario richiesto per l'efficiente gemmazione in particolari contesti e tipi cellulari (Strack *et al.*, 2003, Usami *et al.*, 2007, Fujii *et al.*, 2007). Tale ipotesi è avvalorata dalla capacità di AIP1/Alix, qualora sovraespressa, di revertire i difetti di gemmazione dei mutanti del dominio tardivo PTAP in modo dipendente dall'interazione di AIP1/Alix con il *late domain* ausiliario YPLTSL ed

a sua volta dall'interazione della stessa con la proteina CHMP4 di ESCRT-III (Usami *et al.*, 2007). Recentemente è stato dimostrato che per funzionare correttamente, AIP1/Alix coopera, attraverso il suo dominio Bro1, con i motivi *zinc-finger* contenuti nel nucleocapside di Gag di HIV-1. La distruzione contemporanea di tali motivi e del *late domain* principale, PTAP, porta a difetti nella gemmazione tipici dei mutanti degli *L-domains*, nonostante la sovraespressione di AIP1/Alix. Visto che gli effetti dell'inattivazione funzionale degli *zinc-fingers* e del dominio tardivo PTAP non sono additivi, si ipotizza che questi motivi funzionino nello stesso *pathway* dei *late domains* durante la replicazione virale (Popov *et al.*, 2008, Dussupt *et al.*, 2009). Ulteriori evidenze sperimentali dimostrano come la regione NC-p1 di Gag conferisca dipendenza dal *pathway* ESCRT per la produzione di particelle virali (Popova *et al.*, 2010). Nel complesso, gli studi finora condotti supportano un modello (Figura 3.10) nel quale la regione nucleocapsidica di Gag di HIV-1 coopera con i domini tardivi PTAP e YPLTSL del dominio p6 per reclutare i componenti dell'apparato proteico cellulare necessario per la gemmazione del retrovirus dalla cellula infettata (Dussupt *et al.*, 2009).

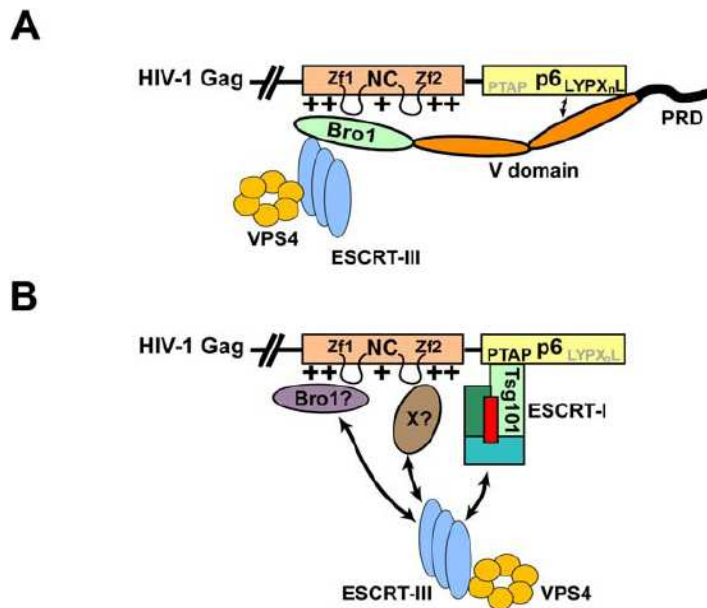


Figura 3.10: Modello di cooperazione del nucleocapside di Gag di HIV-1 con il *pathway* di gemmazione **A)** LYPX_nL/ALIX e **B)** PTAP/TSG101 (da Dussupt *et al.*, 2009).

3.4 Fattori cellulari dell'ospite in grado di interferire nel ciclo di replicazione retrovirale

Molti determinanti cellulari possono favorire o contrastare sia le fasi iniziali del ciclo replicativo virale, tra cui l'ingresso, la spogliazione ed il trasporto del genoma al nucleo (Cooley *and* Lewin, 2003, Cullen, 2003), sia le fasi terminali, come l'assemblaggio delle particelle mature ed il loro rilascio (Morita *and* Sundquist, 2004). D'altro canto, i virus si sono adattati all'ambiente cellulare, sviluppando appropriate strategie al fine di ottimizzare la produzione di progenie virale.

Scoperte recenti hanno messo in evidenza complesse interazioni, precedentemente valutate solo in parte, tra retrovirus e il proprio ospite. In particolare, oltre alla classica risposta immunitaria acquisita e innata, l'uomo e gli altri mammiferi hanno evoluto, in milioni di anni di continui contatti con patogeni virali, fattori antivirali (*host restriction factor*) che conferiscono all'ospite una significativa resistenza all'infezione da parte di questi parassiti intracellulari. Siccome questi fattori di restrizione sono in generale costitutivamente espressi nell'organismo dell'ospite, essi forniscono una piattaforma intrinseca in grado di fornire una difesa nei confronti delle infezioni virali. Inoltre, in alcuni tipi di cellule e di tessuti, questi fattori antivirali possono essere indotti in risposta all'interferone di tipo I, indicando come essi appartengono al sistema innato inducibile. Tali difese infine, sono efficaci a partire dalla prima interazione fra l'ospite ed il virus. L'importanza di questi fattori di restrizione nella replicazione e nella patogenesi dell'infezione da retrovirus è stata messa in luce dai meccanismi con cui alcune proteine virali si sono evolute in modo da evadere e contrastarne l'attività antivirale (Malim *and* Emerman, 2008, Neil *and* Bieniasz, 2009, Kirchhoff, 2010).

Fino ad ora, studi compiuti su HIV-1 hanno portato all'identificazione di tre maggiori classi di proteine cellulari ad azione antivirale, in grado di interferire a specifici livelli del ciclo replicativo retrovirale (Figura 3.11): TRIM5 α (*TRIPartite Motif Protein 5 alpha*) nell'*uncoating*, APOBEC3G (*Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, Catalitic polipeptide-like 3G, A3G*) nella retrotrascrizione del genoma e teterina nel rilascio delle particelle virali. TRIM5 α è stata inizialmente identificata come importante determinante della resistenza delle cellule di scimmia all'infezione da parte di HIV-1 (Stremlau *et al.*, 2004). In particolare, TRIM5 α è in grado di agire prima dell'integrazione del provirus nel genoma della cellula bersaglio, andando a disassemblare in modo specifico i capsidi retrovirali in ingresso (Towers *et al.*, 2000, Stremlau *et al.*, 2006). APOBEC3G è un fattore

antivirale in grado di prevenire l'infezione produttiva di HIV-1, nel caso in cui sia assente la proteina accessoria Vif (Sheehy *et al.*, 2002). In assenza di Vif, infatti, A3G è incorporato nella particella virale durante la gemmazione, attraverso l'interazione con l'RNA genomico e con Gag (Bogerd *and* Cullen, 2008). Come conseguenza, A3G è veicolato in una nuova cellula bersaglio dove catalizzerà la deaminazione dei residui citidina (C) in uridina (U) nel filamento genomico nascente negativo durante la retrotrascrizione mediata da RT. Queste variazioni, una volta verificatesi, causano un elevato accumulo di cambiamenti guanosina (G) verso adenosina (A) nella sequenza del filamento positivo. Questo fenomeno, noto come ipermutazione "G-A", è sufficiente a limitare la diffusione di questi virus in quanto vi è una significativa perdita dell'informazione genetica virale (Harris *and* Liddament, 2004). Nella maggior parte delle infezioni da HIV-1, la proteina accessoria Vif, se presente, è in grado di antagonizzare l'azione di A3G attraverso il reclutamento dell'ubiquitino ligasi cullin-RING che ne induce la poliubiquitinazione e la successiva degradazione. In questo modo, Vif è in grado di eliminare A3G dalle cellule in cui il virus viene prodotto, impedendone così l'incorporazione nella particella virale (Mehle *et al.*, 2004). Infine, un altro fattore antivirale cellulare identificato di recente è teterina (dall'inglese "tether", ovvero trattenere) in grado di inibire il rilascio delle particelle virali mature trattenendole (da qui il nome) sulla superficie cellulare (si veda Paragrafo 3.5) (Neil *et al.*, 2008, Van Damme *et al.*, 2008).

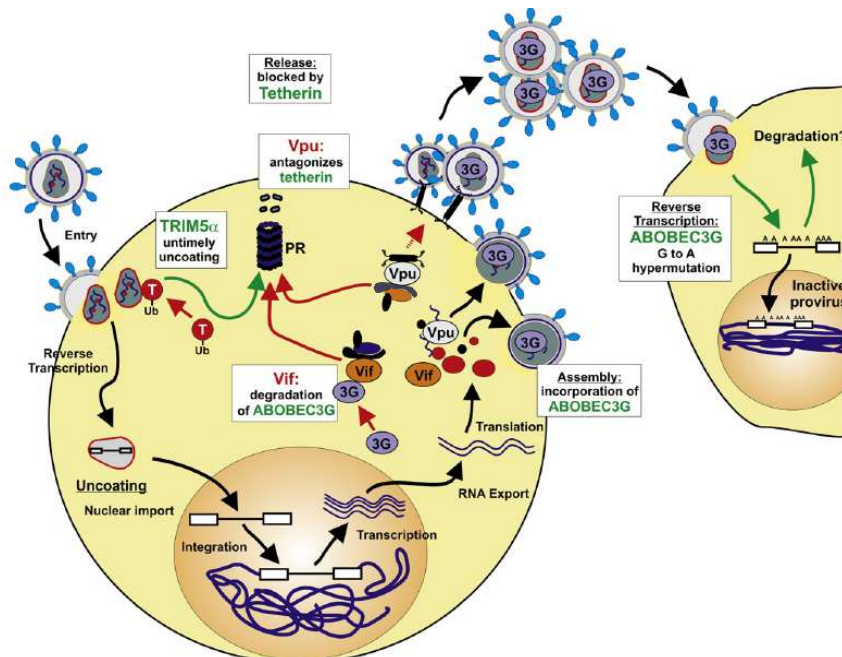


Figura 3.11: Fattori di restrizione antivirale dell'ospite e principali antagonisti di HIV-1 (da Arhel *and* Kirchhoff, 2010).

La delucidazione dei meccanismi con cui i fattori di restrizione interferiscono con la replicazione retrovirale, in particolare nel caso HIV-1, non risulta ancora del tutto completa. L'importanza di caratterizzare in maggior dettaglio questi aspetti è data dalla possibilità di identificare nuove forme terapeutiche per l'AIDS/HIV ma anche, soprattutto, per lo sviluppo di animali modello per questa patologia (Neil *and* Bieniasz, 2009).

3.5 Teterina

L'attività antivirale di teterina è stata scoperta grazie all'investigazione del gene accessorio di HIV-1 *vpu*. E' noto da tempo ormai come Vpu sia in grado di regolare il rilascio dei virioni maturi e completi dalla superficie della cellula infettata da HIV-1 in modo dipendente dal tipo cellulare (Klimkait *et al.*, 1990, Varthakavi *et al.*, 2003, Neil *et al.*, 2006). Infatti, in cellule dette Vpu-dipendenti (es. linfociti T primari, macrofagi, linee cellulari T e nella linea cellulare HeLa), i virioni maturi di HIV-1 Vpu⁻ si accumulano sulla superficie cellulare e in compartimenti intracellulari, senza alcun effetto sul processamento o sul trasporto della proteina Gag (Göttlinger *et al.*, 1993, Neil *et al.*, 2006, Harila *et al.*, 2006). Tali virioni possono essere recuperati in seguito a trattamento con specifiche proteasi, indicando come questo effetto sia mediato dall'attività di proteine (Neil *et al.*, 2007). Esperimenti di eterocarionti tra linee cellulari Vpu-dipendenti (es. HeLa) e Vpu-indipendenti (es. COS-7) hanno dimostrato come Vpu diventi indispensabile per il corretto rilascio virale di HIV-1, indicando così in Vpu stesso l'antagonista virale di tale fattore cellulare (Varthakavi *et al.*, 2003). E' stato inoltre documentato come Vpu aumenti il rilascio non solo di HIV-1, ma anche quello del retrovirus della Leucemia Murina (MLV) o di VLPs ottenute dalle proteine strutturali del virus Ebola, indicando come questa proteina accessoria antagonizzi un fattore cellulare in grado di bloccare il rilascio di diversi virus in modo non specifico (Göttlinger *et al.*, 1993, Neil *et al.*, 2006). Inoltre, l'espressione di BST-2 è indotta in seguito al trattamento con interferone α (Neil *et al.*, 2007), proteina in grado di scatenare le difese antivirali cellulari (Poli *et al.*, 1989), suggerendo la sua appartenenza al sistema immunitario innato in grado di limitare la diffusione di questi tipi di virus. Nel 2008, Neil e colleghi hanno identificato BST2 (*Bone Stromal Marrow antigen Type 2*, anche riferita teterina, CD317 o HM1.24) come il fattore cellulare in grado di inibire il rilascio di HIV-1 in assenza della proteina accessoria Vpu, e hanno riportato come quest'ultima sia in grado di contrastarne l'effetto. In particolare è stato dimostrato quanto segue: i)

BST2 è costitutivamente espresso in cellule Vpu-dipendenti (HeLa), ma non in quelle Vpu-indipendenti (cellule embrionali di rene umano 293T); ii) l'espressione di BST2 è aumentata in alcune linee cellulari in seguito a trattamento con interferone α ; iii) l'espressione di teterina in 293T inibisce il rilascio di HIV-1 Vpu⁻ senza interferire con l'espressione o il processamento di Gag; e infine iv) la deplezione di teterina in cellule HeLa mediante siRNA permette il rilascio di HIV-1 Vpu⁻ (Neil *et al.*, 2008).

3.5.1 Caratteristiche generali di BST2

Nell'uomo è presente una singola copia del gene *bst2* localizzata nel cromosoma 19p13.2 (Ishikawa *et al.*, 1995), che sembra essere relativamente non-polimorfico (Tokarev *et al.*, 2009). Gli ortologi presenti in altri mammiferi sono caratterizzati non solo da sostanziali polimorfismi, principalmente nel caso di alcune scimmie del Nuovo Mondo (McNatt *et al.*, 2009, Liu *et al.* 2010), ma anche da duplicazioni del gene, in particolare nei ruminanti *Bos taurus* e *Ovis aries* (Arnaud *et al.*, 2010). BST-2 è espressa costitutivamente in diversi tipi cellulari: nelle cellule B, nelle cellule T, nelle cellule dendritiche plasmacitoidi, nei macrofagi, nei monociti ed in alcune linee cellulari tumorali derivate dal mieloma multiplo. Inoltre, l'espressione di BST2 può essere indotta in alcune linee cellulari in seguito al trattamento con l'interferone di tipo I (INF-I) (Othomo *et al.*, 1999, Blasius *et al.*, 2006, Neil *et al.*, 2006, Neil *et al.*, 2008).

La teterina caratterizzata in maggior dettaglio al momento è quella umana. Essa fisiologicamente è presente come omodimero di massa molecolare di 30-36 kDa ed è una proteina transmembrana di tipo II con una topologia inusuale, condivisa solamente con un'isoforma della proteina prionica (Ohtomo *et al.*, 1999, Kupzing *et al.*, 2003). Ogni monomero è costituito dai seguenti quattro domini, riscontrabili anche negli altri ortologi di mammifero:

- ✓ una coda citoplasmatica aminotermine di lunghezza variabile, contenente il motivo conservato YxY in grado di legare gli adattatori AP1 e AP2 del complesso clatrina, importanti nel *pathway* di endocitosi clatrina-dipendente (Rollason *et al.*, 2007). Tale motivo è presente negli ortologi di mammifero (Rollason *et al.*, 2007, Masuyama *et al.*, 2009) ad esclusione dei ruminanti ma, nonostante ciò, non si esclude l'esistenza di altre vie di *sorting* intracellulare (Liu *et al.*, 2010). Tramite la porzione citoplasmatica, BST2 interagisce indirettamente con il *network* cellulare subcorticale di actina (Rollason *et al.*, 2009). Negli ortologi di primati è

presente inoltre il motivo KxxK (Rollason *et al.*, 2007), mentre negli ortologi primati non umani vi è una sequenza D/GDIWK (Jia *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009).

- ✓ Un dominio transmembrana di topologia predetta ad alfa elica (McNatt *et al.*, 2009).
- ✓ Un dominio extracellulare, o *ectodomain*, costituito da una singola alfa elica che forma un *coiled coil* parallelo con una seconda molecola di teterina (Schubert *et al.*, 2010, Hinz *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2010), mediante formazione di legami disolfuro intermolecolari che coinvolgono tre cisteine presenti in questo dominio (Ohtomo *et al.* 1999, Andrew *et al.* 2009). Nella forma umana, l'*ectodomain* ha una lunghezza complessiva di circa 110 aminoacidi (90 Å), con un'elevata potenzialità conformazionale. Infatti, deboli interazioni tra il *coiled-coil* in associazione ai ponti disolfuro garantiscono all'*ectodomain* una grande dinamicità ed una capacità di estensione pari al doppio della sua lunghezza (150-180 Å) (Schubert *et al.*, 2010, Hinz *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2010). Inoltre, a questo livello, sono presenti due siti di N-glicosilazione (Andrew *et al.*, 2009).

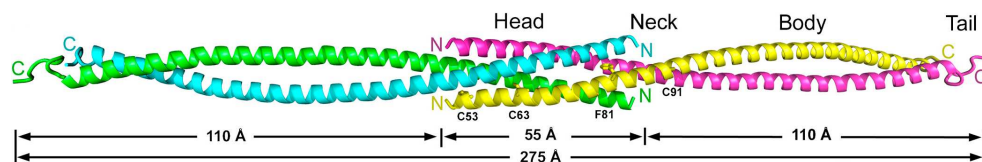


Figura 3.12: Struttura cristallografica dell'*ectodomain* di BST2 (da Yang *et al.*, 2010).

- ✓ Infine, nella regione carbossiterminale, un glicosilfosfatidilinositolo (ancora GPI) permette a BST2 di essere indirizzata ai *raft* lipidici, ricchi in colesterolo e sfingolipidi, a livello della membrana plasmatica (Kupzing *et al.*, 2003). Il segnale dell'ancora GPI è rimosso a livello del reticolo endoplasmatico dove viene sostituito con un glicosilfosfatidilinositolo (Udenfriend and Kodukula, 1995).

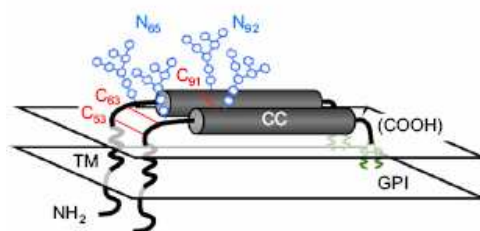


Figura 3.13: Rappresentazione schematica del dimero di teterina (da Perez-Caballero *et al.*, 2009).

Teterina è localizzata, oltre che a livello della membrana plasmatica, anche a livello del sistema endosomiale, in particolare nel *trans-Golgi Network* (TGN), e negli endosomi precoci e di riciclo (Kupzing *et al.*, 2003, Dube *et al.*, 2009, Rollanson *et al.*, 2007, Habermann *et al.*, 2010).

3.5.2 Meccanismo d'azione antivirale di BST2/teterina

BST2 causa il blocco del rilascio delle particelle virali dotate di *envelope* sulla superficie delle cellule infette (Neil *et al.*, 2006, Neil *et al.*, 2008). Teterina è in grado di trattenere le particelle virali completamente formate e mature, in cui l'*envelope* virale risulta discontinuo dalla membrana cellulare, intervenendo quindi dopo la formazione della particella virale, in modo da prevenirne la diffusione alle cellule non infettate. In seguito, i virioni trattenuti vengono internalizzati negli endosomi tardivi (compartimenti CD63+) attraverso endocitosi mediata dai segnali di *sorting* presenti nella coda citoplasmatica aminoterminale e, probabilmente, degradati (Neil *et al.*, 2006, Miyakawa *et al.*, 2009). Le particelle virali aggregate a livello della membrana plasmatica risultano essere meno infettive nel caso in cui vi sia una trasmissione diretta da cellula a cellula (Casartelli *et al.*, 2010, Zhang and Liang, 2010), ma anche nel caso in cui vengano rilasciate in seguito al trattamento con proteasi o metodi fisici (Neil *et al.*, 2006, Casartelli *et al.*, 2010, Zhang and Liang, 2010).

Questo meccanismo antivirale risulta essere non specifico in quanto, teoricamente, qualunque virus dotato di *envelope* lipidico che gemmi a livello della membrana plasmatica può essere bloccato dall'azione di teterina (Evans *et al.*, 2010). Infatti, lo spettro d'azione di BST2 umana è ampio in quanto è stato dimostrato che impedisce il rilascio di virus dotati di *envelope* a RNA, come alfa-, beta-, delta-retrovirus, lentivirus (SIV, HIV-1, HIV-2), spumaretrovirus, arenavirus (Lassa e Machupo), nipahvirus, filovirus (Marburg e Ebola), ma anche a DNA, come l'Herpesvirus del Sarcoma di Kaposi (KSHV) (Gottlinger *et al.*, 1993, Neil *et al.*, 2008, Jouvenet *et al.*, 2009, Kaletsky *et al.*, 2009, Mansuri *et al.*, 2009, Sakuma *et al.*, 2009, Radoshitzky *et al.*, 2010). In linea di principio BST-2, per agire, deve colocalizzare con il virione nascente nel sito di gemmazione (Habermann *et al.*, 2010, Perez-Caballero *et al.*, 2009, Fitzpatrick *et al.*, 2010): questo restringe l'attività di BST2 nei confronti di virus che vengono rilasciati a livello della membrana plasmatica (Evans *et al.*, 2010). Il modello più semplice attualmente proposto è quello in cui teterina, omodimerizzando attraverso il dominio extracellulare, possa trattenere direttamente l'*envelope* del

virione ancorandolo alla membrana della cellula ospite attraverso il dominio transmembrana e l'ancora GPI (Evans *et al.*, 2010, Yang *et al.*, 2010) (Figura 3.14).

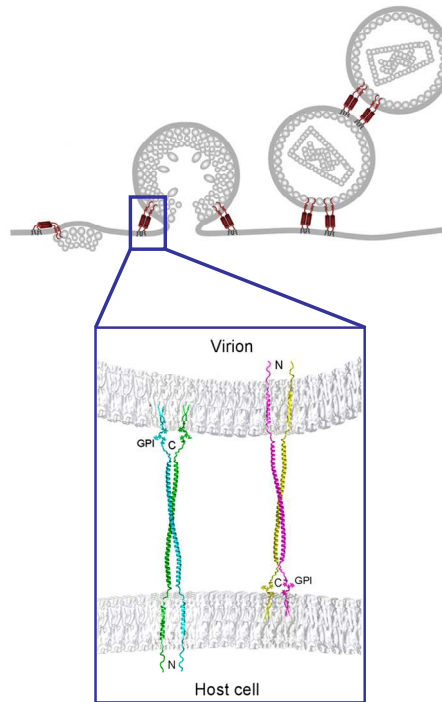


Figura 3.14: Modello di azione antivirale proposto per teterina (da Gupta *and* Towers, 2009 e Yang *et al.*, 2010, modificate).

Queste evidenze suggeriscono come le caratteristiche strutturali generali e le modalità di ancoraggio alle membrane cellulari e virali di BST2 siano sufficienti per l'azione antivirale (Evans *et al.*, 2010). A supporto di questo, infatti, è stato dimostrato che una teterina completamente artificiale, ottenuta assemblando domini di proteine cellulari prive di omologia di sequenza primaria, ma in grado di riprodurre le proprietà strutturali della forma *wild-type* di BST2, è in grado di bloccare il rilascio di HIV-1. Inoltre, i dati ottenuti impiegando questa BST2 artificiale dimostrano come l'attività antivirale non necessiti dell'ausilio di ulteriori cofattori cellulari (Perez-Caballero *et al.*, 2009).

3.5.3 Antagonisti virali

Nel corso del tempo i virus hanno evoluto strategie adatte ad eludere le restrizioni indotte a livello cellulare per contrastare la replicazione del virus e hanno sviluppato specifiche contromisure in grado di neutralizzarne l'effetto. Queste ultime possono essere rappresentate sia da proteine accessorie virali, non necessariamente richieste quindi per la replicazione, sia da proteine strutturali.

Dato che teterina agisce direttamente a livello della superficie cellulare, tali proteine agiscono delocalizzando BST2 lontano dal sito di azione, oppure riducendone i livelli intracellulari (Evans *et al.*, 2010).

Fino ad ora, sono stati identificati sei antagonisti virali in grado di interferire con teterina (Figura 3.15):

- ✓ Vpu di HIV-1: è stato il primo ad essere scoperto (Neil *et al.*, 2008, Van Damme *et al.*, 2008). Molti studi hanno cercato di mettere in luce i *pathway* ed il meccanismo con cui Vpu interferisce con BST2 anche se, per il momento non esiste un modello definitivo. Tale proteina accessoria sembrerebbe essere in grado di rimuoverla dalla superficie cellulare e/o di ridurre i livelli intracellulari, mediante interazione diretta attraverso i reciproci domini transmembrana (Rong *et al.*, 2009). In virtù della nota interazione fra Vpu ed il complesso β -TrCP-SCF, necessario per la degradazione del recettore primario CD4 per HIV-1 (Margottin *et al.*, 1998), è stato dimostrato come tale meccanismo sia coinvolto anche nella parziale degradazione proteasomale/lisosomiale di BST2 (Mitchell *et al.*, 2009, Goffinet *et al.*, 2009). Tali osservazioni suggeriscono come l'interazione fra Vpu e BST2 permetta il reclutamento del complesso β -TrCP, al fine di coinvolgere teterina nel *pathway* che riconosce ubiquitina come segnale di *sorting* (Mangeat *et al.*, 2009, Mitchell *et al.*, 2009). In questo modo, Vpu sequestrerebbe BST2, con o senza concomitante degradazione, a livello del TGN o degli endosomi di riciclo, a livello dei quali queste due proteine colocalizzano, in modo da allontanarla dal sito di azione oppure da impedirne il ritorno alla superficie cellulare (Dube *et al.*, 2010, Hauser *et al.*, 2010). L'attività di Vpu s'è dimostrata essere altamente specie-specifica. Inoltre, Vpu si è dimostrato in grado di essere efficace anche nei confronti della teterina di scimpanzé e di gorilla (Jia *et al.*, 2009, McNatt *et al.*, 2009, Sauter *et al.*, 2009)
- ✓ Nef di SIV: essendo privi della proteina Vpu, gli isolati di SIVsmm (*sooty mangabeys*) e SIVmac (*rhesus macaques*), SIVblu (*Blue monkey*) e SIVagm (*african green monkey*) utilizzano il prodotto del gene *nef* per difendersi dall'attività della BST2 della loro corrispettiva specie, ma non sono in grado di agire nei confronti della forma umana (Jia *et al.*, 2009, Sauter *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009). Nonostante il meccanismo non sia ancora stato chiarito in dettaglio, è stato dimostrato come Nef di SIV interagisca in modo specifico con il motivo D/GDIWK presente esclusivamente negli ortologi dei primati non umani di BST2, ma non nella BST2 umana, in modo da ridurre i livelli presenti a livello della

superficie cellulare (Jia *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009). Importanti per questa funzione di Nef sono il sito di miristilazione, la regione putativa di riconoscimento del colesterolo e i domini importanti per la *down-regolazione* del CD4 (Zhang *et al.*, 2009).

- ✓ Env di HIV-2: è noto ormai da tempo in letteratura, ancora prima dell'identificazione di teterina, come le proteine Env di alcuni isolati di HIV-2 possiedano proprietà simili a quelle di Vpu di HIV-1. Infatti, è stato dimostrato come la loro overespressione permetta di ripristinare il rilascio delle particelle di HIV-1 prive di Vpu in cellule Vpu-dipendenti (Bour *et al.*, 1996). HIV-2, in contrasto al suo predecessore SIV_{smm}, utilizza Env per sequestrare BST2 dalla superficie cellulare al TGN, senza indurne contestualmente la degradazione (LeTortorec *and* Neil 2009, Hauser *et al.*, 2010). HIV-2 Env, infatti, interagisce fisicamente tramite il suo *ectodomain* con il dominio extracellulare di BST2 e con il complesso AP2, mediando così l'endocitosi clatrina-dipendente del fattore antivirale. Per fare ciò, HIV-2 Env richiede la presenza del segnale Gyxxθ nel dominio citoplasmatico di gp41, che lega il complesso AP2-clatrina, e il sito di proteolisi in Env fra gp120 e gp41 (LeTortorec *and* Neil 2009).
- ✓ Env di SIV: è stato dimostrato che SIV_{amg}Tan (*African green monkey, Tantalus monkeys*) utilizza, al posto di Nef, la proteina strutturale Env per antagonizzare la *tetherin* della propria specie. In particolare, sono stati osservati il medesimo meccanismo di azione e gli stessi determinanti virali di Env di HIV-2 (Gupta *et al.*, 2009).
- ✓ K5 di KSHV: tra le prime proteine virali ad essere state identificate in grado di interferire con BST2 umana. K5 è un membro delle ubiquitino ligasi RING-CH associate alla membrana ed è in grado di ubiquitinare le lisine 18 e 28 della coda citoplasmatica di BST2 indirizzandola così alla degradazione lisosomiale attraverso il *pathway* ESCRT (Mansouri *et al.*, 2009, Pardieu *et al.*, 2010).
- ✓ Glicoproteina (GP) dei filovirus: anche i filovirus Ebola e Marburg, hanno evoluto tale antagonista virale per neutralizzare la teterina umana (Kaletsky *et al.*, 2009, Radoshitzky *et al.*, 2010). Come nel caso dell'Env di HIV-2, GP è in grado di interagire fisicamente, nella sua forma immatura e non completamente glicosilata, con BST2, ma non è grado né di rimuoverla dalla superficie cellulare né di alterarne i livelli intracellulari (Kaletsky *et al.*, 2009). GP, a differenza dell'ENV di HIV-2 o di SIV, non possiede alcun motivo di *sorting* nella sua coda citoplasmatica e, inoltre, per la sua funzione non richiede l'integrità del sito di processamento

proteolitico di GP. Questi due aspetti sembrerebbero indicare come GP intercetti BST2 durante la sua maturazione in modo da sequestrarla lontano dai siti di gemmazione del virus (Kaletsky *et al.*, 2009).

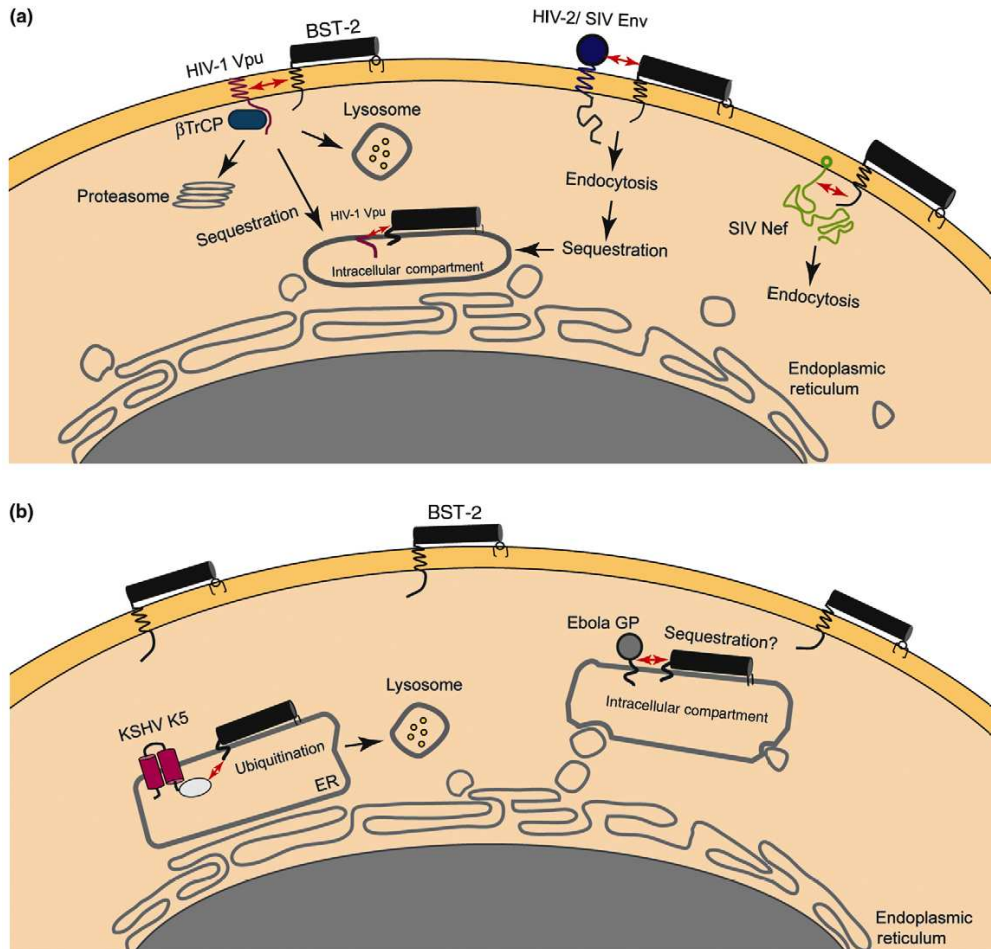


Figura 3.15: Antagonisti di teterina e loro possibile meccanismo d’azione: **a)** lentivirus e **b)** altri virus eterologhi appartenenti a famiglie diverse da quella *Retroviridae* (da Evans *et al.*, 2010).

3.5.4 Ruolo di teterina nell’evoluzione dei lentivirus e nella pandemia dell’AIDS

I geni codificanti i fattori di restrizione cellulare sono soggetti ad una forte selezione positiva ed evolvono velocemente, in modo da difendere l’ospite da nuovi patogeni emergenti. Come conseguenza, TRIM5 α , APOBEC3G e teterina nell’ambito delle diverse specie di mammiferi possiedono un elevato grado di divergenza nella loro sequenza, costituendo cosÌ una barriera alle trasmissioni virali zoonotiche (Kirchhoff, 2010). Nonostante ciÒ, i lentivirus che infettano i

Studiando l'evoluzione delle proteine virali di questi SIV e di HIV-1 nei confronti di teterina, è stato possibile osservare (Figura 3.16c) come SIVrcm utilizzi Nef, in quanto sprovvisto del gene *vpu*, e di come SIVgsn/mus/mon impieghi Vpu (Sauter *et al.*, 2009). Analisi filogenetiche dimostrano come SIVcpz abbia acquisito Nef da SIVrcm e Vpu da SIVgsn/mus/mon; tuttavia la presenza del motivo conservato D/GDIWK nella coda citoplasmatica di BST2 di scimpanzé ha permesso a SIVcpz di servirsi del prodotto del gene *nef* per antagonizzarne l'effetto (Figura 3.16b). Dopo la trasmissione di SIVcpz al gorilla, Nef è stato mantenuto come fattore antivirale di teterina, in quanto la BST2 del gorilla differisce di soli due aminoacidi dalla controparte in scimpanzé (Sauter *et al.*, 2010). Nel passaggio da SIVcpz all'uomo, invece, è importante precisare che APOBEC3G e TRIM5 α non sembrano aver contribuito in modo significativo nell'imporre una barriera di specie. È stato dimostrato infatti come Vif di SIVcpz è in grado di antagonizzare in modo efficiente l'attività di A3G umano (Gaddis *et al.*, 2004) e come il capsido di SIVcpz sia completamente refrattario alla forma umana di TRIM5 α (Kratovac *et al.*, 2008). Nell'uomo teterina sembra quindi aver stabilito il maggiore ostacolo per questo evento di trasmissione *cross*-specie. Infatti, è stato dimostrato come BST2 umana risulti completamente refrattaria all'antagonismo di Nef di SIVcpz, in quanto non possiede il motivo D/GDIWK nella coda citoplasmatica, probabilmente perso nel corso dell'evoluzione durante precedenti infezioni di lentivirus antichi (Zhang *et al.*, 2009). Questa barriera si presuppone sia stata la causa dello *switch* da Nef a Vpu in HIV-1 per l'antagonismo virale verso BST2 umana. Inoltre, l'incapacità della proteina Nef di SIV di agire nei confronti della teterina umana spiegherebbe come HIV-2, originato da SIVsmm e privo della proteina accessoria Vpu, abbia evoluto Env per antagonizzare in modo efficace BST2 (LeTortorec *and* Neil, 2009). È stato osservato come Vpu di HIV-1 abbia partecipato in maniera rilevante al diffondersi della pandemia del gruppo M di HIV-1, in quanto si è evoluto in modo efficiente per antagonizzare BST2 umana, mantenendo l'abilità di *down*-regolare il recettore CD4. La proteina Vpu del gruppo O, meno rappresentato invece, pur essendo in grado di interferire con l'espressione del CD4, risulta inefficiente nell'antagonizzare BST2. Infine, il raro gruppo N mantiene una limitata attività nei confronti di BST2, ma non è in grado di indurre la degradazione del recettore CD4 (Sauter *et al.*, 2009).

4. OBIETTIVI

Il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) e il Virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV-1) condividono numerose similitudini nel loro ciclo replicativo, nei *target* cellulari e nella patogenesi dell'infezione. Questi aspetti rendono FIV e il suo ospite naturale, il gatto domestico, un modello importante nella ricerca sull'AIDS, in particolare per lo sviluppo di vaccini e di farmaci in grado di interferire con le fasi del ciclo replicativo virale. Nell'ambito dei lentivirus, inoltre, FIV rappresenta uno strumento di grande interesse per lo sviluppo di un sicuro sistema di *delivery* per il trasferimento genico in quanto mantiene la capacità di integrarsi nel genoma di cellule in fase quiescente ma, a differenza di HIV-1, non risulta patogeno per l'uomo. Nonostante i numerosi progressi compiuti nell'identificare i meccanismi molecolari alla base dell'infezione di FIV, in parte basati sulla comparazione con HIV-1, molti aspetti della sua biologia sono ancora poco noti. In particolare, sono ancora da definire in maggior dettaglio i determinanti virali e cellulari coinvolti nelle fasi tardive del ciclo replicativo. Questa tesi di dottorato si è proposta di contribuire a chiarire i meccanismi molecolari degli eventi tardivi della replicazione di FIV e si focalizza, in particolare, sull'investigazione dell'interazione tra proteine cellulari e virali coinvolte nella gemmazione del virus dalla cellula infettata.

Nella prima parte della ricerca ci si è proposti di caratterizzare la regione di Gag al fine di studiarne il contributo nella fase di gemmazione e di analizzare il *pathway* cellulare impiegato da FIV durante il rilascio dei virioni dalle cellule infettate. E' noto infatti come l'espressione della sola poliproteina Gag di FIV, in assenza di ogni altra proteina virale, porti alla formazione di particelle simil-virali (VLPs) in grado di gemmare dalle cellule. Il processo di distacco delle particelle dalla membrana della cellula ospite è guidato principalmente dai domini tardivi (*late domains*) presenti a livello di Gag. A partire da tali evidenze, sono stati generati specifici costrutti FIV-derivati, recanti mutazioni nella regione carbossiterminale di Gag in combinazione con alterazioni a livello del nucleocapside, e ne è stato valutato l'impatto sul rilascio di VLPs. Inoltre, è stato caratterizzato il coinvolgimento della proteina cellulare AIP1/Alix, appartenente al *pathway* di biogenesi dei MVB, nel cooperare con i *late domain* e con il nucleocapside nella gemmazione di tali virus mutanti.

Nella seconda della ricerca invece è stata investigata la presenza di fattori cellulari potenzialmente in grado di interferire con il rilascio delle particelle virali di FIV. Studi recenti hanno infatti dimostrato come la proteina cellulare umana teterina

sia in grado di limitare il rilascio delle particelle virali di HIV-1 dalle cellule infettate. E' stato inoltre evidenziato come HIV-1 abbia evoluto specifiche contromisure per antagonizzarne l'effetto. A partire da queste evidenze, è stato identificato l'ortologo nel genoma felino di *bst2* umana e né è stato caratterizzato il ruolo funzionale, valutandone la capacità di interferire con il rilascio di particelle retrovirali. Si è infine proceduto ad analizzare i determinanti virali in grado di antagonizzarne l'effetto.

5. MATERIALI e METODI

Materiali

5.1 Linee cellulari

Per questo lavoro sperimentale sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

293T: cellule embrionali renali umane, a morfologia stellata, che esprimono costitutivamente l'antigene proteico T del Virus Vacuolante della Scimmia (SV40) permettendo in questo modo un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici contenenti l'origine di replicazione di tale virus. La linea cellulare è stata gentilmente fornita dal Dott. D. Baltimore (Rockefeller University, New York).

CrFK: (*Crandell Feline Kidney*) cellule fibroblastoidi derivanti dalla porzione corticale del rene di gatto di 10-12 settimane ottenute dall'*American Type Culture Collection* (ATCC CCL-94).

HeLa: cellule epiteliali umane derivate dall'adenocarcinoma della cervice uterina, immortalizzate dal Papillomavirus 18 (HPV-18) ottenute dall'*American Type Culture Collection* (ATCC CCL-2).

Le linee cellulari 293T, CrFK e HeLa sono state coltivate in terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) addizionato con 1% (v/v) degli antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml) e con il 10% (v/v) di FCS (*Fetal Calf Serum*) inattivato a 56°C per 30 minuti.

Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore (Hereaus BDD 6220) alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5% (v/v) di CO₂ e sottoposte a periodici controlli per escludere eventuali contaminazioni.

5.2 Plasmidi

pSVC21: contiene il DNA provirale completo del clone molecolare di HIV-1 HXBc2 (*vif*⁺ / *vpu*⁻ / *vpr*⁻ / *nef*⁻).

pSVC21 vpu+: contiene il DNA provirale completo del clone molecolare di HIV-1 HXBc2 con la sequenza *vpu*⁻ sostituita con quella corrispondente *vpu*⁺, derivata dal clone molecolare di HIV-1 pNL4.3.

pCDNA3.1+®: plasmide contenente il promotore del Cytomegalovirus umano (CMV), i geni per la resistenza ad ampicillina e neomicina, il promotore e l'origine di SV40 ed il segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino (BGH) (Invitrogen®).

pCR®2.1-Topo®: plasmide linearizzato avente una singola deossitimidina (dTTP) a cui è legata covalentemente la Topoisomerasi I del Virus Vaccino all'estremità 3', in grado di catalizzare la formazione del legame fosfodiesterico fra il vettore e frammenti di DNA di interesse, amplificati attraverso PCR, aventi all'estremità 3' una singola deossiadenuina (dATP) (Invitrogen®).

pSP73®: il plasmide presenta l'origine batterica ColE1 e il promotore delle RNA polimerasi del fago SP6 e del fago T7, rispettivamente in posizione 5' e 3' rispetto al sito di policlonaggio (Promega®).

pΔLTR: contiene i geni *gag*, *pol*, *vif*, *ORF-A*, *rev*, *env*, la sequenza RRE di FIV, derivanti dal clone molecolare p34TF10. La LTR al 5' è sostituita dal promotore del CMV e quella al 3' è modificata con il segnale di poli-adenilazione BGH. pΔLTR è clonato all'interno del sito di policlonaggio del plasmide di clonaggio pUC119, mediante inserimento a livello dei siti di restrizione EcoRI e SalI. Sono, inoltre, presenti le origini di replicazione batterica, ColE1, e fagica, F1, e il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina. Questo vettore è stato gentilmente fornito dal Prof. M. Pistello (Università di Pisa).

pΔenv1: il plasmide contiene i geni *gag*, *pol*, *vif*, *orf-A*, *rev* e la sequenza RRE di FIV, derivanti dal clone molecolare p34TF10. Rispetto al genoma di FIV *wild-type*, pΔenv1 presenta la LTR all'estremità 5' sostituita dal promotore del CMV e quella all'estremità 3' modificata con il segnale di poliadenilazione del BGH. Il costrutto reca la delezione di 1 kb nel gene *env* (Δenv) e manca del segnale di incapsidazione (ΔΨ). pΔenv1 è clonato all'interno del sito di policlonaggio del plasmide di clonaggio pUC119, mediante inserimento a livello dei siti di restrizione EcoRI e SalI. Sono, inoltre, presenti le origini di replicazione batterica, ColE1, e fagica, F1, e il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina. Il costrutto è stato gentilmente fornito dal Prof. M. Pistello (Università di Pisa, Italia).

pΔenv1Mut20: derivato dal plasmide pΔenv1, nel quale è stata inserita la mutazione D449A (sequenza aminoacidica del dominio p2, posizioni: 438-450: PSAPPMEEKLLAL).

pΔenv1Mut20A: derivato dal plasmide pΔenv1Mut20, nel quale è stata inserita la mutazione L447A (sequenza aminoacidica del dominio p2, posizioni: 438-450: PSAPPMEEKALAL).

pΔenv1Mut20B: derivato dal plasmide pΔenv1Mut20, nel quale è stata inserita la mutazione L448A (sequenza aminoacidica del dominio p2, posizioni: 438-450: PSAPPMEEKAAAL).

pΔenv1Mut21: derivato dal plasmide pΔenv1Mut20B, nel quale è stata inserita la mutazione L450A (sequenza aminoacidica del dominio p2, posizioni: 438-450: PSAPPMEEKAAAA).

pΔenv1Mut02: derivato dal plasmide pΔenv1, nel quale sono state inserite le mutazioni P438A e P441A (sequenza aminoacidica del dominio p2, posizioni 438-450: ASAAPMEEKLLDL).

pΔenv1Mut21-ASAA: derivato dal plasmide pΔenv1Mut02 in cui sono state introdotte le mutazioni L447A, L448A, D449A e L450A (sequenza aminoacidica del dominio p2, posizioni 438-450: ASAAPMEEKAAAA).

pΔenv1MutΔp2: derivato dal plasmide pΔenv1, nel quale è stato introdotto il codone di stop TAA in luogo del codone CCA, codificante la prima prolina del *late domain* (P438).

pΔenv1Mut6: derivato dal plasmide pΔenv1, è stato inserito un codone di stop a valle del gene *gag*. In particolare, la leucina (codone UUA) in posizione 10 della proteasi è stata sostituita con il codone di stop UAA.

pΔenv1Mut21+6, pΔenv1Mut02+6, pΔenv1MutΔp2+6: questi costrutti presentano, oltre alle mutazioni sopra descritte, il codone di stop in posizione 10 della proteasi virale.

pSP73GagPol: il plasmide contiene la regione Gag-Pol di FIV della dimensione di 1540 pb [sequenza nucleotidica 509-2049 (dove la numerazione nucleotidica riportata considera il primo nucleotide della regione U3 della 5' LTR il nucleotide +1), relativa al clone molecolare p34TF10 (codice accesso NC_001482)]. Sono, inoltre, presenti i promotori delle RNA polimerasi del fago SP6 e del fago T7, posti rispettivamente in 5' e in 3' rispetto al sito di policlonaggio, il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina e l'origine di replicazione batterica ColE1.

pSP73GagPolMut21: derivato dal plasmide pSP73GagPol, nel quale sono state inserite le mutazioni L447A, L448A, D449A e L450A nel dominio p2 di Gag (sequenza aminoacidica del dominio p2, posizioni 438-450: PSAPPMEEKAAAA).

pSP73GagPolMut02: derivato dal plasmide pSP73GagPol, nel quale sono state inserite le mutazioni P438A e P441A a livello del dominio tardivo PSAP di FIV (sequenza aminoacidica del dominio p2, posizioni 438-450: ASAAPMEEKLLDL).

pSP73GagPolMutΔp2: derivato dal plasmide pSP73GagPol, nel quale è stato introdotto il codone di stop TAA in luogo del codone CCA, codificante la prima prolina del late domain (P438).

pSP73GagPolMut6; pSP73GagPolMut21+6; pSP73GagPolMut02+6; pSP73GagPolMutΔp2+6: derivati dal plasmide pSP73GagPol, nel quale, oltre alle mutazioni precedentemente descritte, è stato inserito un codone di stop a valle del gene *gag*. In particolare, la leucina (codone UUA) in posizione 10 della proteasi è stata sostituita con il codone di stop UAA.

pBJ5: il plasmide consente l'espressione in cellule eucariotiche di sequenze geniche grazie alla presenza di un promotore ibrido (SRα), costituito dalla sequenza del promotore precoce di SV40 fusa con le regioni R e U5 derivate dalla LTR del Virus della Leucemia Umana tipo 1 (*Human T-cell Leucemia Virus type 1*, HTLV-1) (Takebe *et al.*, 1988). Il costrutto è stato gentilmente concesso dal Dott. H. Göttinger (Harvard Medical School, Boston).

pBJ5-AIP1HA: derivato da pBJ5, questo costrutto consente l'espressione della forma *wild type* della proteina cellulare AIP1/Alix (*ALG-2 interacting protein 1*) coniugata all'epitopo emoagglutinina (HA). Il plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. H. Göttinger (Harvard Medical School, Boston).

pBJ5UbHA: questo plasmide deriva da pBJ5 e consente l'espressione di monomeri di ubiquitina (Ub) fusi con un *tag* costituito dal peptide dell'emoagglutinina del virus dell'influenza (HA) all'estremità carbossiterminale (Strack *et al.*, 2002).

pBJ5Vps4Flag: è un plasmide derivato da pBJ5. A livello dei siti di restrizione *XhoI* e *EcoRI* del sito di clonaggio multiplo è stato inserito il gene esprimente la proteina Vps4, fusa con la sequenza codificante l'epitopo Flag. Il plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. H. Göttinger (Harvard Medical School, Boston) (Strack *et al.*, 2003).

pBJ5Vps4^{E228Q}Flag: è un plasmide derivante da pBJ5Vps4Flag. In questo costrutto, il gene codificante la proteina Vps4 è stato mutato a livello della posizione 228 della sequenza aminoacidica, sostituendo il residuo di acido glutammico con l'aminoacido glutamina (Vps4^{E228Q}). Il plasmide è stato gentilmente fornito dal Dott. H. Göttinger (Harvard Medical School, Boston) (Strack *et al.*, 2003).

pBluescript®II KS(+): il plasmide presenta l'origine di replicazione fagica, F1, e batterica, ColE1, e il promotore delle RNA polimerasi del fago T3 e del fago T7, rispettivamente in posizione 5' e 3' rispetto al sito di policlonaggio (Stratagene®).

Per l'amplificazione dei diversi plasmidi in cellule procariotiche è stato utilizzato il ceppo DH5 α di *E. coli* [F'/endA1 hsdR17 (rk-mk+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (NaIr) relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR (ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)] (Biolabs Inc. ®) oppure il ceppo STBL3 di *E. coli* [F- mcrB mrr hsdS20 (rB-, mB-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20 (StrR) xyl-5 λ - leu mtl-1] (Invitrogen ®).

I batteri sono stati coltivati in forma liquida in terreno Luria-Bertani [L.B.: Bactotriptonne 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 da amplificare. Quando necessario, il terreno è stato solidificato mediante aggiunta di agar 1.5% (p/v). Quando richiesto, è stato aggiunto l'antibiotico di selezione.

5.3 Oligonucleotidi

Nelle reazioni di amplificazione a catena della polimerasi (PCR), di mutagenesi e di sequenziamento sono stati utilizzati oligonucleotidi innesco (*primer*) opportunamente disegnati e riportati in Tabella 5.1.

Gli oligonucleotidi contrassegnati dalla sigla NC, K, R, OrfAMut1 o FIVEnvFR1 sono stati impiegati nelle reazioni di mutagenesi; gli oligonucleotidi contenenti la sigla BST-2 sono stati utilizzati per l'amplificazione di teterina; mentre gli oligonucleotidi FIV2F, FIV2R, FIVseq, M13F, M13R, SP6, T7, OrfAFW e BGH sono stati utilizzati per il sequenziamento dei diversi plasmidi.

Nome primer	Sequenza nucleotidica (5'-3')	T _M
NC390F	CCAGGACATCTAGCAAGACAATCTAGAGAAGTGAAAAAAT	73.9°C
NC390R	ATTTTTTCACTTCTCTAGATTGTCTTGCTAGATGTCCTGG	73.9°C
NC377F	AAAGGATCAGGACCAGTGTCTTTTAATTGTAAAAAACCAGGACAT	77.3°C
NC377R	ATGTCCTGGTTTTTTTACAATTA AAAAGACACTGGTCCTGATCCTTT	77.3°C
NC396F	TAGAGAAGTGAAAAAATCTAATAAATGTGGAAAACCTGGTCATGTAG	74.6°C
NC396R	CTACATGACCAGGTTTTCCACATTTATTAGATTTTTTCACTTCTCTA	74.6°C
NC409F	CCTGGTCATGTAGCTGCCAAATCTTGGCAAGGAAATAGAAAGAAT	81.1°C
NC409R	ATTCTTTCTATTTCCCTTGCCAAGATTTGGCAGCTACATGACCAGG	81.1°C
K371F	GTTCAAGTAGTGCAATCAAGAGGATCAGGACCAGTGTGT	78.4°C
K371R	ACACACTGGTCCTGATCCTCTTGATTGCACTACTTGAAC	78.4°C
K381/382F	CCAGTGTGTTTTAATTGTAGAAGACCAGGACATCTAGCAAGA	76.3°C
K381/382R	TCTTGCTAGATGTCCTGGTCTTCTACAATTA AACACACTGG	76.3°C
R388F	AGACCAGGACATCTAGCAGCACAATGTAGAGAAGTGAAA	76.8°C
R388R	TTTCACTTCTCTACATTGTGCTGCTAGATGTCCTGGTCT	76.8°C
R391F	GGACATCTAGCAGCACAATGTGCAGAAGTGAAAAAATGTAATAAA	77.9°C
R391R	TTTATTACATTTTTTCACTTCTGCACATTGTGCTGCTAGATGTCC	77.9°C
OrfAMut1F	TTATGGTCGGGAGAATTATGAATGTAAGCAATAATAGTATTATTCAATAGG	78.4°C
OrfAMut1R	CCTATTGAATAATACTATTATGTCTTAACATTCATAATTCTCCCACCATAA	78.4°C
FivEnvFR1FW	GTTTAGAAGAGCAAGATTTTTAATCGGTATTCTGATGAAAGTGTATT	73.5°C
FivEnvFR1RV	AATACACTTTCATCAGAATACCGATTAAAAATCTTGCTCTTCTAAAC	73.5°C
cBST-2FW	GCCACCATGGCACCTGCTTTTTACCCTATTGG	79.5°C
cBST-2FlagFW	GCCACCATGGATTACAAGGATGACGACG ATAAGGCACCTGCTTTTTACCAC	86.2°C
cBST-2RV	CTACAGTCTTTCCACCTCCACCGAAGCGTTCTG	78.7°C
3'cBST-2RV	TCAGGCCAGCAGAGCAACGAAG	72.9°C
hBST-2FW	GCCACCATGGCATCTACTTCGTATGAC	72.4°C
hBST-2FlagFW	GCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAG GCATCTACTTCGTATGAC	84.1°C
hBST-2Rv	TCACTGCAGCAGAGCGCTGAGG	74.5°C
cBST2bRV	CTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCAGTTCCCTTTTCTCAG	76.7°C
cBST2cFW	GATTACAAGGATGACGACGATAAGGAGACCTCGAGCAAG	79.2°C
hBST2bRV	CTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGTAGTACTTCTTGTC	73.0°C
hBST2cRV	GATTACAAGGATGACGACGATAAGCCCAGCTCCCAGGAC	82.3°C
M13F	GTAAAACGACGGCCAG	50°C
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	50°C
FIV2F	GCATGGTATCTCGAGGCATT	50°C
FIV2R	TAATGCTTTTATACTCAAGTC	61°C
FIVseq	ATGTGGAAAACCTGGTCATGT	67°C
SP6	CTGGTTCTATAGTGTACCTAAAT	69°C
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	48°C
OrfAFw	GCCACCATGGAAGACATAATAGTATTATTCAATAGGGTCA	74°C
BGH	TAGAAGGCACAGTCGAGGC	50°C

Tabella 5.1: Oligonucleotidi utilizzati e loro principali caratteristiche.

Metodi

5.4 Quantificazione degli acidi nucleici

Quando necessario, la quantità di DNA plasmidico è stata determinata allo spettrofotometro (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, Thermo Scientific®) mediante lettura della densità ottica (D.O.) di diluizioni degli acidi nucleici alla lunghezza d'onda di 260 nm, corrispondente al massimo picco di assorbimento per le basi azotate.

La concentrazione del DNA è stata ricavata grazie alla legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon * l * C$$

dove A è l'assorbanza del campione, ε è il coefficiente di estinzione molare (pari a $6600 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ per il DNA a doppio filamento e $6220 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ per l'RNA a singolo filamento), l è la lunghezza del cammino ottico (pari a 0.1 cm) e C la concentrazione dell'acido nucleico in soluzione. La presenza di eventuali contaminazioni di tipo proteico è stata rilevata analizzando la lunghezza d'onda di 280 nm, alla quale il legame peptidico presenta il picco massimo di assorbimento. Sono state considerate pure le preparazioni in cui il rapporto A_{260}/A_{280} era compreso tra i valori 1.8 e 2.0.

5.5 Competenza e trasformazione batterica

I plasmidi e i prodotti delle reazioni di ligazione sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule batteriche *E. coli*, ceppo DH5 α oppure ceppo STBL3, rese artificialmente competenti mediante la tecnica del cloruro di calcio.

La competenza batterica è stata ottenuta facendo crescere le colonie batteriche a 37°C in 3 ml di terreno liquido LB contenente MgCl₂ 15 mM, in assenza di antibiotico per circa 12 ore. In seguito l'inoculo è stato trasferito in 400 ml dello stesso terreno. Una volta raggiunta la densità ottica di 0.4 alla lunghezza d'onda di 600 nm, la coltura è stata raffreddata in modo rapido in ghiaccio al fine di 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

ricentrifugati, delicatamente risospesi in 10 ml della medesima soluzione fredda addizionata di glicerolo al 15% (v/v) e quindi aliquotati e conservati a -80°C.

La trasformazione batterica è stata effettuata aggiungendo il DNA plasmidico (100-300 ng) oppure i prodotti di ligazione a 50 µl di batteri competenti, incubando poi in ghiaccio per 30 minuti. In seguito i batteri sono stati sottoposti a shock termico mediante esposizione a 37°C per 2 minuti, raffreddati in ghiaccio e incubati a 37°C per un'ora in 200 µl di LB, consentendo così l'espressione e la sintesi della proteina che conferisce la resistenza all'antibiotico di selezione. Infine, tutta la sospensione è stata seminata in piastre Petri contenenti LB-Agar addizionato con ampicillina 100 µg/ml e incubata 16 ore a 37°C al fine di selezionare i batteri trasformati.

5.6 Preparazione di DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato estratto dal ceppo DH5α oppure dal ceppo STBL3 di *E. coli* con il metodo della lisi alcalina applicato per preparazioni plasmidiche in piccola scala (*miniprep*) per piccoli volumi di coltura batterica (1-2 ml). Questa procedura utilizza il potassio acetato ad elevata molarità (5 M) per precipitare le molecole di DNA ad alto peso molecolare. Il DNA così ottenuto è stato precipitato con alcool etilico e successivamente risospeso in TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8) contenente RNAsi pancreatica 20 µg/ml.

Per ottenere preparazioni plasmidiche ad elevato grado di purezza e in grande scala (*maxi prep*) adatte alla trasfezione delle cellule eucariotiche, il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il “*QIAGEN Plasmid MAXI Kit*” basato sull'utilizzo di colonne a scambio anionico QIAGEN®. Attraverso questo procedimento il DNA plasmidico si lega alla resina della colonna utilizzando tamponi a bassa concentrazione salina, mentre viene purificato da RNA, proteine e impurità ad alto peso molecolare. Il DNA plasmidico viene poi eluito dalla colonna per mezzo di tamponi ad elevata concentrazione salina. Il plasmide, in seguito, viene concentrato e pulito da sali mediante precipitazione con isopropanolo e lavaggio con etanolo al 70% (v/v).

Il DNA ottenuto è stato controllato mediante restrizione enzimatica, mentre la presenza di eventuali contaminazioni e la resa è stata valutata tramite tecniche spettrofotometriche (si veda Paragrafo 5.10).

5.7 Mutagenesi

Le mutazioni effettuate in questo lavoro sperimentale sono state eseguite con il kit “*QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit*” (Stratagene®). Il protocollo prevede la sintesi del filamento mutante a partire dal template di interesse mediante PCR, la digestione del DNA parentale e infine la trasformazione della molecola mutante in cellule di *E. coli* (ceppo DH5 α) competenti.

La procedura sperimentale prevede, innanzitutto, la reazione di sintesi del filamento mutante mediante PCR. Si prepara la seguente miscela: 5 μ l di buffer di reazione 10X (Stratagene®), circa 50 ng di DNA template a doppio filamento, 125 ng di oligonucleotidi innesco contenenti la sostituzione nucleotidica (si veda Tabella 5.1), 1 μ l di miscela contenente i 4 dNTPs (Applied Biosystem®) ed acqua milliQ fino a volume di 50 μ l. Successivamente si è aggiunto 1 μ l di *PfuUltra™ High-Fidelity* DNA polimerasi (2.5 U/ μ l). Vengono effettuati 16 cicli di amplificazione in termociclatore, comprendenti una fase di denaturazione a 95°C per 30 secondi, una fase di appaiamento degli oligonucleotidi a 55°C per 1 minuto e una fase di elongazione a 68°C per chilobase di vettore stampo. Allo scopo di denaturare il DNA stampo e di attivare la polimerasi, i 16 cicli vengono preceduti da un’incubazione delle miscele di reazione a 95°C per 30 secondi.

Dopo la reazione di amplificazione, la miscela viene incubata in ghiaccio per 2 minuti al fine di raffreddarla e, di seguito, viene aggiunto 1 μ l di endonucleasi di restrizione DpnI (10 U/ μ l) allo scopo di digerire il DNA parentale emimetilato o metilato. La reazione viene centrifugata per 1 minuto a 13000 rpm e incubata a 37°C per 1 ora.

L’ultima fase prevede la trasformazione di 1 μ l di DNA trattato con DpnI in 50 μ l di batteri *E. coli* competenti (ceppo DH5 α), incubando poi la miscela in ghiaccio per 30 minuti. In seguito i batteri sono stati sottoposti a shock termico mediante esposizione a 42°C per 45 secondi, raffreddati in ghiaccio e incubati a 37°C per un’ora in 500 μ l di LB, consentendo così l’espressione e la sintesi della proteina che conferisce la resistenza all’antibiotico di selezione. Infine, metà della sospensione viene seminata in piastre Petri contenenti LB-Agar addizionato con ampicillina 100 μ g/ml e incubata 16 ore a 37°C al fine di selezionare i batteri trasformati.

Le colonie batteriche ottenute vengono incubate in 3 ml di terreno liquido LB contenente ampicillina 100 μ g/ml e lasciate incubare a 37°C per circa 16 ore in agitazione. Il DNA plasmidico mutato viene infine purificato mediante *miniprep* (si veda Paragrafo 5.6) e successivamente sequenziato (si veda Paragrafo 5.12),

per valutare l'inserimento della mutazione desiderata. I *primer* utilizzati per il sequenziamento sono riportati in Tabella 5.1.

5.8 Estrazione dell'RNA e tecniche di RT-PCR

L'RNA totale di cellule HeLa e CrFK è stato estratto mediante l'impiego del sistema "*RNeasy Mini Kit*" (QIAGEN) basato sull'utilizzo di colonne ad affinità, in cui la membrana è costituita da un gel di silice. Queste colonne consentono di purificare gli RNA di lunghezza superiore a 200 b direttamente da un lisato cellulare. La procedura sperimentale ha previsto la lisi delle cellule in presenza di un tampone contenente guanidina isotiocianato (GITC), che inattiva le RNAsi cellulari, e β -mercaptoetanololo, un agente in grado di ridurre i ponti disolfuro. Quindi, dopo l'aggiunta di etanolo al 70% (v/v), l'estratto cellulare è stato trasferito in colonna dove è stato centrifugato a 13000 rpm per 15 secondi. L'eluato è stato eliminato e la colonna sottoposta a lavaggi con opportuni tamponi, necessari per rendere il legame dell'RNA più restrittivo. Infine, l'RNA è stato eluito in 30 μ l di acqua DEPC.

L'RNA, dopo essere stato quantificato allo spettrofotometro, è stato retrotrascritto utilizzando la retrotrascrittasi (RT) di MoMLV, enzima in grado di retrotrascrivere l'RNA a DNA in presenza di ioni magnesio. Sono stati utilizzati oligonucleotidi innesco universali. La reazione prevede l'utilizzo dell'RNA totale estratto (5 μ g), di un tampone (5 mM KCl e 1 mM Tris HCl pH 8.3), di MgCl₂ (5.5 mM), di una miscela contenente i quattro dNTPs (0.4 mM), di 2.5 μ M di primer universali (Applied Biosystem), di RNAsin (inibitore dell'RNAsi, 20 U) e infine della RT di MoMLV (125 U). Tutti i reagenti utilizzati sono della Applied Biosystem. Il volume totale della reazione è stato portato a 50 μ l aggiungendo acqua DEPC. Tale miscela è stata posta nel termociclatore (Termal Cycler 2400, Perkin Elmer) che è stato impostato a 25°C per 10 min (fase di attivazione), 42°C per 50 min (fase di allungamento), 95°C per 5 minuti (fase di inattivazione). I trascritti sono stati poi sottoposti a reazione di PCR (si veda Paragrafo 5.9), in particolare sono stati amplificati 10 μ l della miscela di retrotrascrizione, contenente il cDNA, con la coppia di oligonucleotidi innesco (Tabella 5.1) specifica per il trascritto ricercato.

5.9 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Per l'amplificazione di opportuni frammenti di DNA veniva utilizzata la tecnica PCR. Generalmente venivano preparate delle miscele contenenti 5 µl di un tampone *10x PCR buffer* (Tris-HCl pH 8.3 e KCl 500 mM, 1.5-3 µl di MgCl₂ (25 mM)) (Applied Biosystem) o di tampone *10x PfuUltra HF reaction buffer* (Stratagene®) a seconda della polimerasi utilizzata, 2.5 µl di ciascuno degli opportuni oligonucleotidi innesco (10 µM), 5 µl di dNTPs (100 mM), 0.5 - 1 µl di *AmpliTaq Gold* DNA polimerasi (5 U/µl) (Applied Biosystem) o *PfuUltra™ High-Fidelity* DNA polimerasi (2.5 U/µl) (Stratagene®) a seconda dell'esigenza, 50-200 ng di DNA ed acqua deionizzata fino ad un volume di 50 µl. Si effettuavano 35-40 cicli di amplificazione in termociclatore (Termal Cycler 2400 Perkin Elmer), comprendenti una fase di denaturazione a 95°C, appaiamento degli oligonucleotidi alla temperatura richiesta e di elongazione a 72°C. In ogni caso si procedeva ad un'incubazione delle miscele di reazione a 95°C per 2-5 minuti prima dei cicli di PCR. Questo allo scopo di denaturare il DNA e di attivare, se richiesto, la polimerasi. I frammenti ottenuti venivano caricati in gel di agarosio di opportuna concentrazione (p/v) utilizzando marcatori di peso molecolare (Roche/Boehringer) per verificare che le dimensioni dell'amplificato fossero corrette.

5.10 Restrizioni enzimatiche

In questo lavoro sperimentale, le diverse reazioni di restrizione 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 enzima e delle quantità di DNA da digerire. Al termine della digestione, i campioni sono stati diluiti in colorante [Glicerolo al 5% (p/v), Blu di bromofenolo 0,15% (p/v), Xilene cianolo allo 0,02% (p/v) e EDTA 0,002 M] al fine di visualizzare il fronte di migrazione della corsa elettroforetica e facilitare l'entrata del campione di DNA nel pozzetto d'agarosio all'1% (p/v) (Seakem). Al gel d'agarosio è stato addizionato bromuro di etidio (0,5 µg/ml), molecola fluorescente che si intercala fra le basi di DNA, rendendolo visibile quando irradiato con luce UV. Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato il tampone salino TBE 1X (Tris-borato 0,009 M, EDTA 1 mM pH 8). Inoltre, per verificare la corretta dimensione dei frammenti sono stati utilizzati opportuni marker di peso molecolare noto, tra cui il "Marker

VII' (0,25 µg/ml; bande 576/7427/6106/4899/3639/2799/1953/1882/1515/1482/1164/992/710/492/359 pb); il "Marker II" (0,25 µg/ml; bande 23130/9416/6557/4361/2322/2027/564 pb); e il "Marker VIII" (0,25 µg/ml; bande 1114/900/692/501/489/404/320/242/190/147/124/110/67/37/34/26/19 pb) (Roche/Boehringer).

5.11 Tecniche di clonaggio

La strategia di clonaggio prevede di ottenere il frammento da clonare mediante restrizione enzimatica a partire dal plasmide appropriato. Alla fine della reazione la miscela viene sottoposta a corsa elettroforetica in gel d'agarosio per controllare la corretta dimensione dei frammenti, mediante l'utilizzo di marker di peso molecolare noto. Il frammento di gel, contenente la banda corretta, viene inciso con un bisturi ed il DNA viene purificato attraverso l'uso del kit QUIAGEN® "QIAquick gel extraction kit". Questo sistema è basato sulla solubilizzazione dell'agarosio e sul successivo legame specifico degli acidi nucleici alla membrana di silice-gel di una colonna a scambio anionico in presenza di un agente caotropico. La separazione finale del DNA linearizzato da sali ed enzimi è resa possibile attraverso una serie di eluizioni progressive. Dopo il taglio enzimatico, la sequenza è inserita nel plasmide opportuno, anch'esso trattato mediante reazione enzimatica per permettere l'introduzione del frammento. Per tale scopo è usata la DNA ligasi del batteriofago T4 (4×10^5 U/ml) (Biolabs), enzima in grado di catalizzare in vitro la formazione di legami fosfodiesterici tra il residuo fosfato in 5' ed il gruppo idrossilico in 3' delle estremità adiacenti. Le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 20 µl, impiegando 1 unità di ligasi e incubate a 16°C per 16 ore.

Le quantità di vettore ed inserto da utilizzare nella reazione di ligazione vengono determinate utilizzando la seguente formula:

$$X \text{ (ng)} = [Y \text{ pb} \times 300 \text{ ng}] / V \text{ pb}$$

Dove: X = ng inserto
 Y pb = paia di basi dell'inserto
 300 ng = 300 ng di vettore
 V pb = paia di basi del vettore plasmidico

I prodotti di ligazione sono poi utilizzati per la trasformazione dei batteri come descritto nel Paragrafo 5.5.

Le colonie resistenti all'ampicillina vengono incubate in 5 ml di terreno LB, in presenza di antibiotico (100 µg/ml), e fatte crescere 16 ore a 37°C in agitazione. La presenza del DNA plasmidico viene verificata usando il protocollo delle "miniprep" (si veda Paragrafo 5.6). Successivamente il DNA plasmidico viene controllato mediante reazione enzimatica, gel elettroforesi e sequenziamento (si veda Paragrafo 5.12).

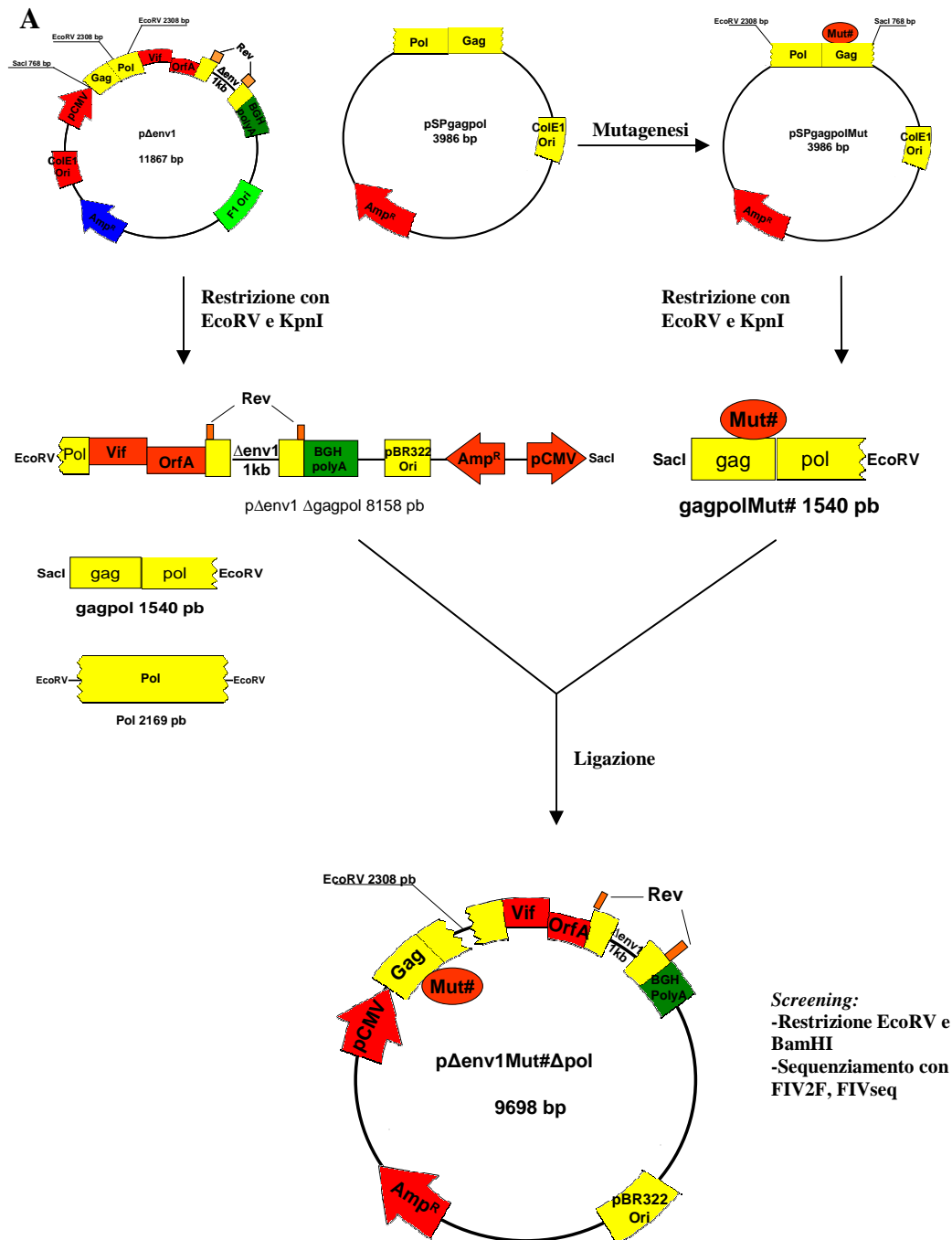
5.11.1 Ottenimento dei plasmidi pΔenv1 recanti le mutazioni a livello del nucleocapside e dei late domain

I costrutti mutanti sono stati ottenuti mediante reazioni di mutagenesi sito-specifica dirette contro la sequenza nucleotidica codificante il dominio nucleocapside del precursore Gag: VVQSKGSGPVCFNCKKPGHLARQCREVKKCNKCGKPGHVAAKCWQ (posizioni 367-411 a partire dal primo residuo di Gag. I motivi *zinc-fingers* sono sottolineati nella sequenza).

Le mutazioni sono state introdotte nei plasmidi pSP73GagPol o nei costrutti mutanti da esso derivati, disponibili in laboratorio, che presentano il frammento genico *gag-pol* di FIV (1540 pb) rispettivamente con sequenza *wild-type* o recante le mutazioni a livello della regione p2 di Gag (Paragrafo 5.2). Le reazioni di mutagenesi si sono avvalse dell'impiego di coppie di *primer* opportunamente disegnati (Tabella 5.1), mentre l'avvenuta introduzione delle mutazioni desiderate è stata valutata mediante il sequenziamento dei costrutti ottenuti con i *primer* FIV2F e SP6.

I frammenti genici *gag-pol* di FIV contenenti le mutazioni desiderate sono stati, in seguito, inseriti nel plasmide pΔenv1, che dispone di tutti gli elementi necessari per l'espressione di geni lentivirali in cellule eucariotiche. A questo scopo sono stati effettuati due successivi passaggi molecolari che hanno previsto l'impiego di specifiche endonucleasi di restrizione e l'allestimento di opportune reazioni di ligazione. In particolare, sono stati, dapprima, ottenuti i costrutti mutanti intermedi pΔenv1Δpol, caratterizzati dalla presenza della sequenza Gag-Pol di FIV derivante dai plasmidi pSP73GagPol e dalla delezione di un ampio frammento del gene *pol*, e, in seguito, i plasmidi mutanti pΔenv1, mediante inserimento del frammento del gene *pol* nei costrutti intermedi. I costrutti ottenuti in ciascuna fase di clonaggio sono stati controllati mediante restrizione enzimatica

e sequenziati per valutare la presenza delle mutazioni desiderate nella regione Gag-Pol di FIV e il corretto orientamento dell'inserto.



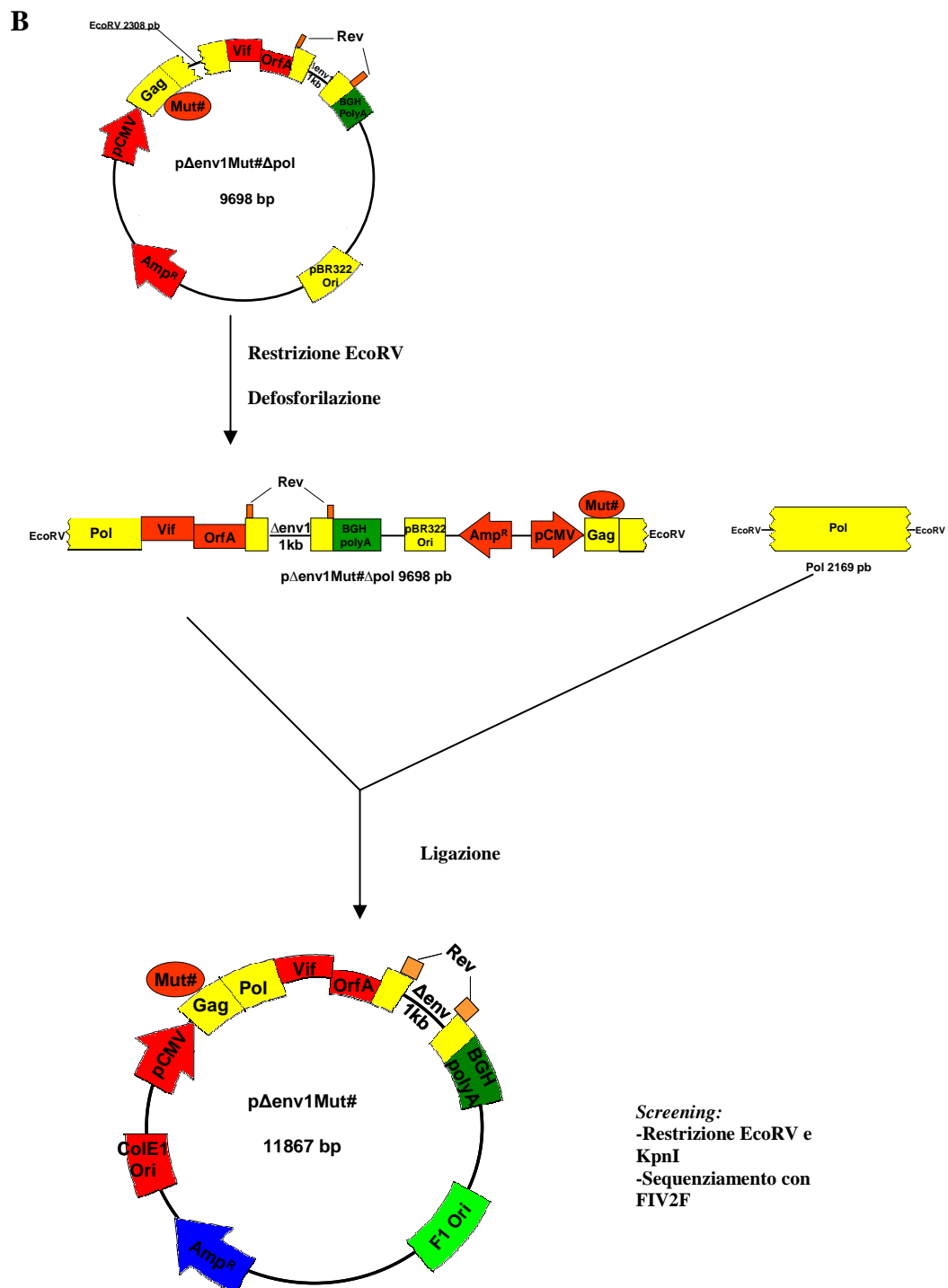
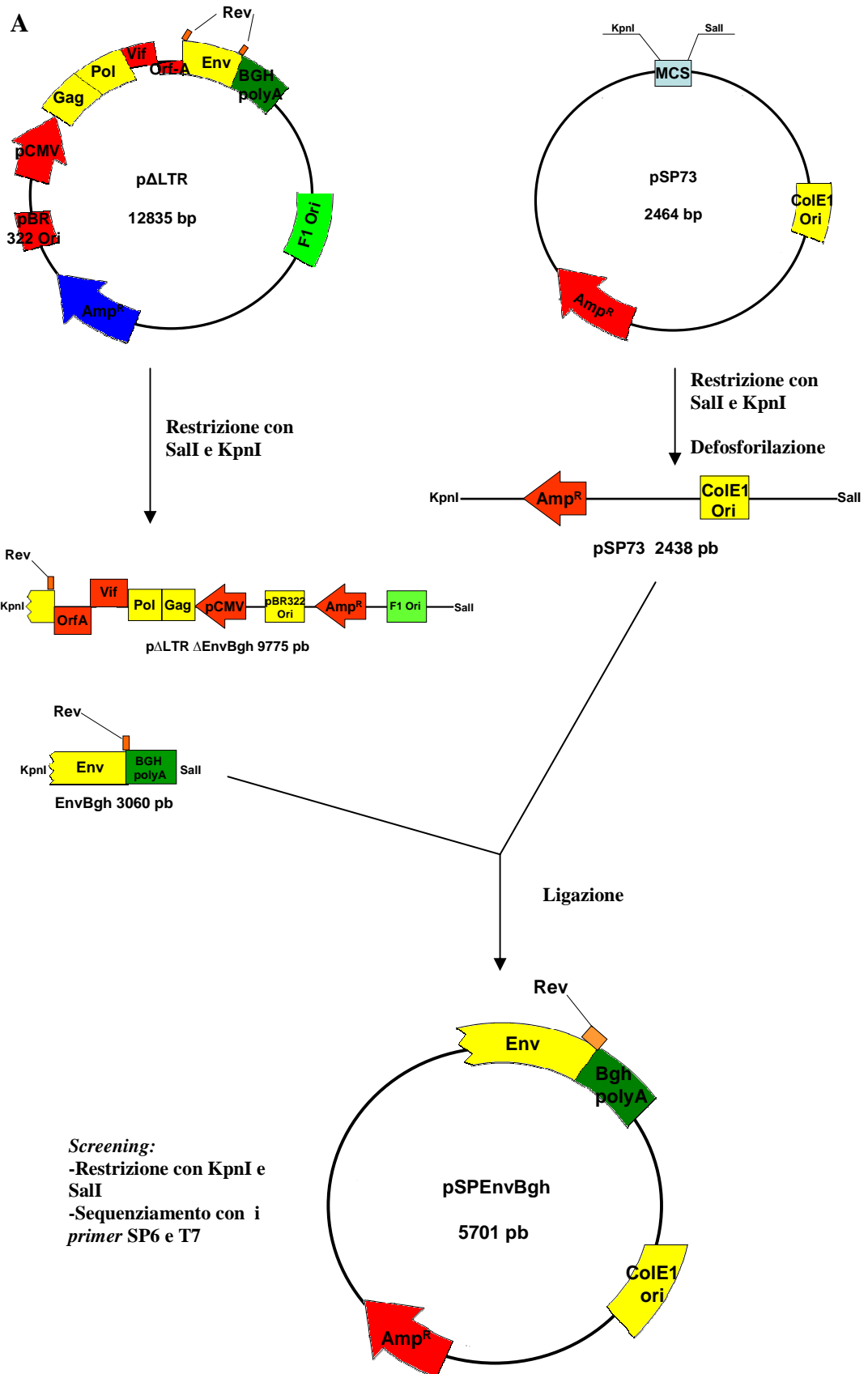


Figura 5.1: Rappresentazione schematica dell'ottenimento dei costrutti mutanti intermedi pΔenv1Δpol, mediante ligazione del vettore pΔenv1ΔgagΔpol, ottenuto dal plasmide pΔenv1, con l'inserto Gag-Pol recante le mutazioni di interesse, estratto dal plasmide pSP73GagPol (A), e di quello dei plasmidi mutanti pΔenv1, mediante ligazione dei costrutti intermedi pΔenv1Δpol, ottenuti nella precedente fase di clonaggio, con il frammento del gene *pol*, estratto dal plasmide pΔenv1 (B). Gag: porzione della ORF del gene *gag*; pol: ORF del gene *pol*; Vif, Orf-A, Rev: ORFs minori di FIV rappresentanti i geni *vif*, *orf-A* e *rev*; Δenv 1kb: delezione di 1 kb a carico del gene *env*; pCMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-polyA: segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina.

5.11.2 Ottenimento del plasmide p Δ LTR_{Env}FR1

Al fine di introdurre il *frameshift* a livello della sequenza codificante Env di p Δ LTR, preliminarmente è stato sviluppato un plasmide idoneo per la mutagenesi contenente il segmento genico di interesse. Il frammento *env-bgh* (3060 pb) è stato estratto tramite opportune endonucleasi di restrizione e clonato nel vettore pSP73. Il plasmide così ottenuto è stato denominato pSP_{Env}BGH. Successivamente, mediante reazione di mutagenesi sito-specifica (Paragrafo 5.7) diretta contro la sequenza nucleotidica codificante *env* di FIV, sono stati introdotti i nucleotidi TC in posizione 268 bp (a partire dal primo nucleotide del gene *env*) attraverso l'impiego di una opportuna coppia dei *primer* FivEnvFR1FW e FivEnvFR1RV (Tabella 5.1). L'avvenuta introduzione della mutazione desiderata è stata valutata mediante il sequenziamento con i *primer* T7 e SP6.

Il frammento genico *env-bgh* contenente il *frameshift*, in seguito, è stato inserito nel plasmide p Δ LTR, che dispone di tutti gli elementi necessari per l'espressione di geni lentivirali in cellule eucariotiche, mediante specifiche endonucleasi di restrizione e l'allestimento di opportune reazioni di ligazione. Il costrutto ottenuto è stato controllato mediante restrizione enzimatica e sequenziato per valutare la presenza della mutazione desiderata nella regione *env* di FIV e il corretto orientamento dell'inserito.



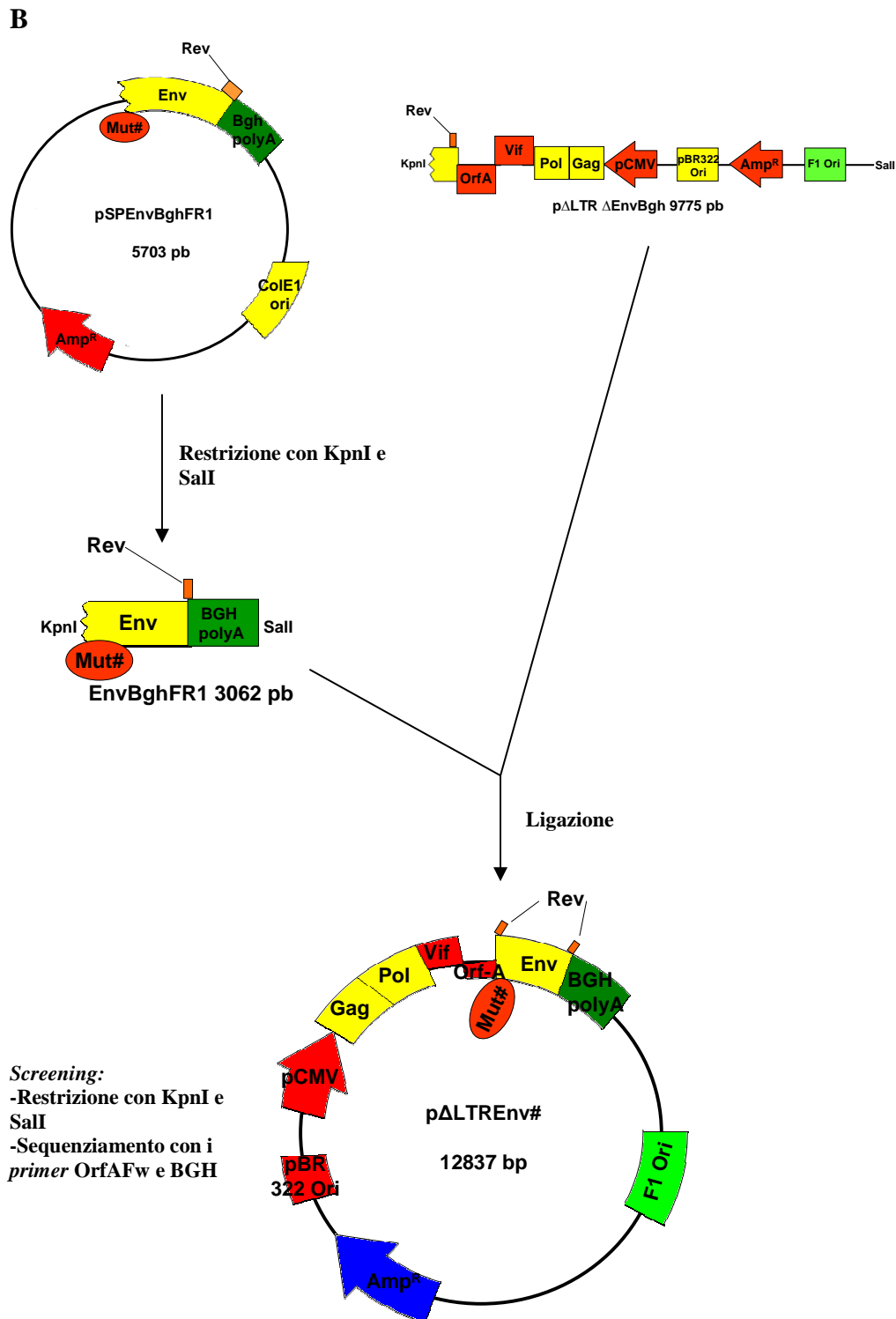
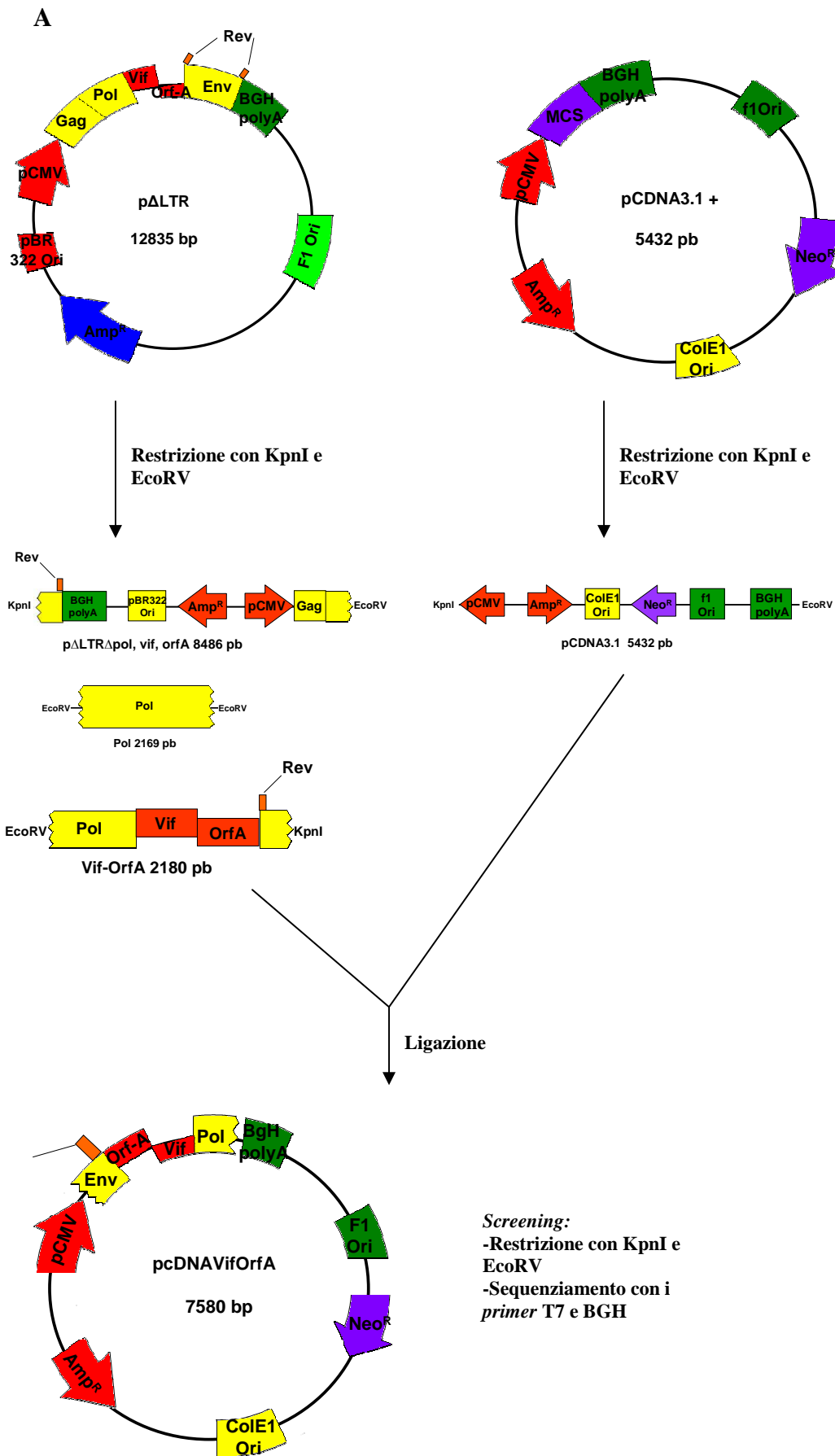


Figura 5.2: Rappresentazione schematica dell'ottenimento del costrutto intermedio pSPEnvBGH, mediante ligazione del vettore pSP73, con l'inserto *env-bgh*, estratto dal plasmide pΔLTR (A), e di quello del plasmide mutante pΔLTRFR1, mediante ligazione del frammento *env-bghFR1*, recante la mutazione di interesse, ed il frammento pΔLTRΔEnvBGH, ottenuto nella precedente fase di clonaggio estratto dal plasmide pΔLTR (B). Gag: porzione della ORF del gene *gag*; pol: ORF del gene *pol*; Vif, Orf-A, Rev: ORFs minori di FIV rappresentanti i geni *vif*, *orf-A* e *rev*; *env*: ORF del gene *env*; pCMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-poly-A: segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina.

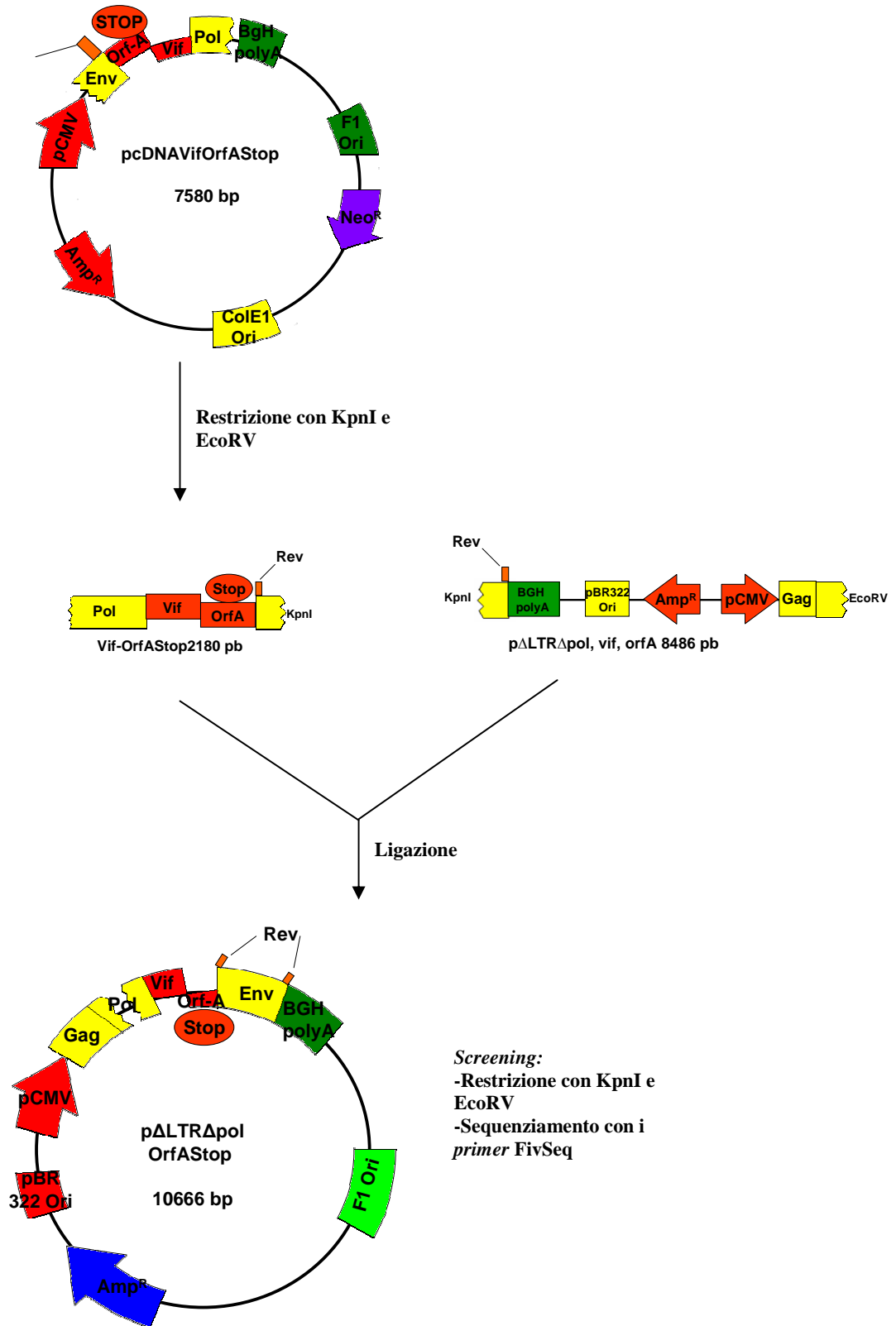
5.11.3 Ottenimento del plasmide p Δ LTROrfAStop

Allo scopo di rendere il gene *orf-A* non funzionale, è stato introdotto un codone di stop dopo il codone di inizio della traduzione della sequenza codificante Orf-A di p Δ LTR. Preliminarmente, è stato sviluppato un plasmide idoneo per la mutagenesi contenente il segmento genico di interesse *vif-orf-A* (2180 pb), estratto tramite opportune endonucleasi di restrizione e clonato nel vettore pcDNA3.1. Il plasmide così ottenuto è stato denominato pcDNAVifOrfA. Successivamente, mediante reazione di mutagenesi sito-specifica (Paragrafo 5.7) diretta contro la sequenza nucleotidica codificante *orf-A* di FIV, è stato introdotto il codone di stop attraverso l'impiego di una opportuna coppia di *primer*, OrfAMut1F e OrfAMut1R (Tabella 5.1). L'avvenuta introduzione della mutazione desiderata è stata valutata mediante il sequenziamento con i *primer* T7 e BGH.

Il frammento genico *vif-orf-A* contenente la mutazione a livello del gene *orf-A*, in seguito, è stato inserito nel plasmide p Δ LTR, che dispone di tutti gli elementi necessari per l'espressione di geni lentivirali in cellule eucariotiche. A questo scopo sono stati effettuati due successivi passaggi molecolari che hanno previsto l'impiego di specifiche endonucleasi di restrizione e l'allestimento di opportune reazioni di ligazione. In particolare, sono stati ottenuti il costrutto mutante intermedio p Δ env1 Δ polOrfAStop, caratterizzato dalla presenza della sequenza Orf-A di FIV derivante dal plasmide pcDNAVifOrfAStop e dalla delezione di un ampio frammento del gene *pol* e, in seguito, il plasmide finale p Δ env1OrfAStop, mediante inserimento del frammento del gene *pol* nel costrutto intermedio. Il plasmide p Δ env1OrfAStop è stato controllato mediante restrizione enzimatica e sequenziato per valutare la presenza della mutazione desiderata nella regione *env* di FIV e il corretto orientamento dell'inserto.



B



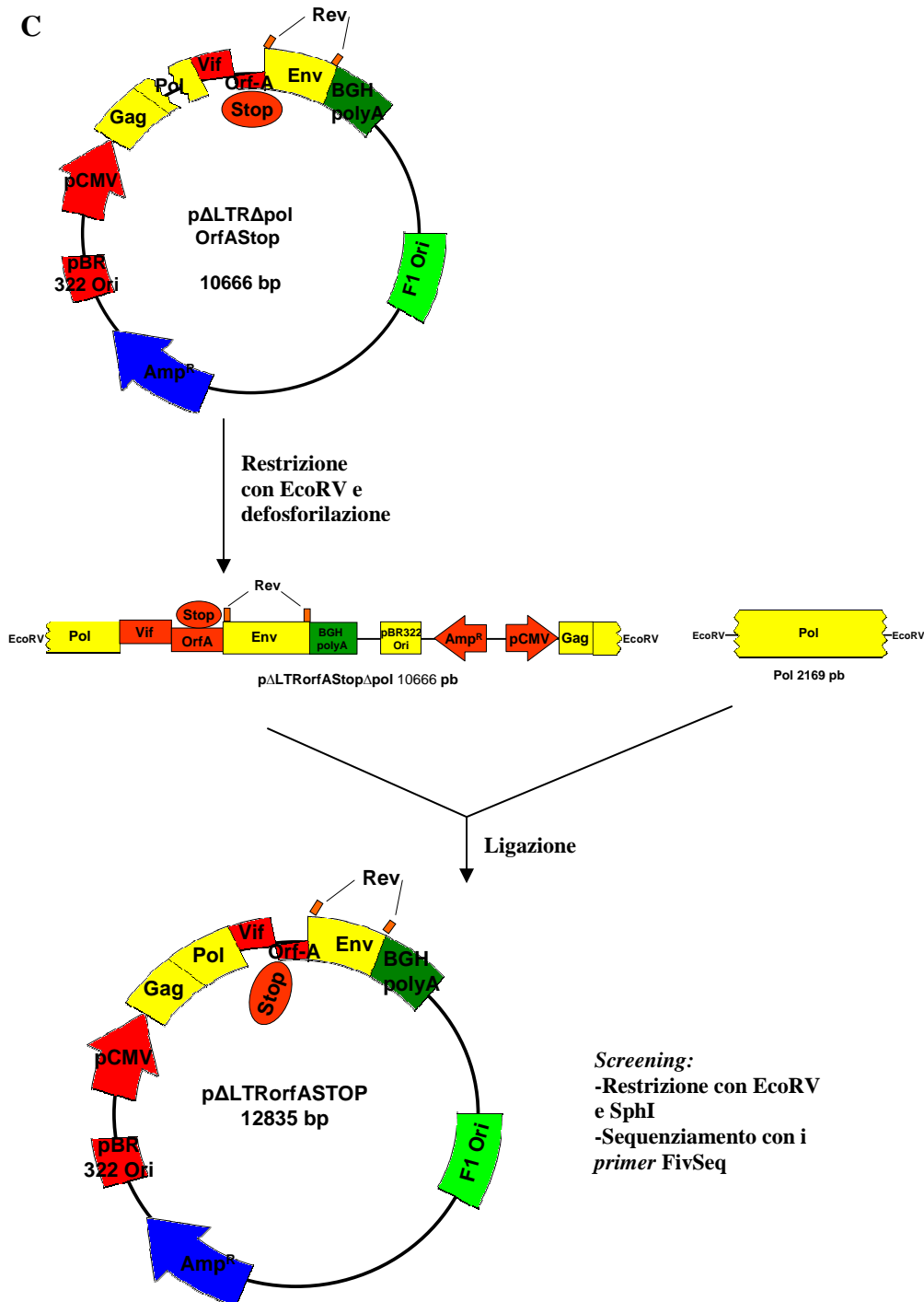


Figura 5.3: Rappresentazione schematica dell'ottenimento (A) del costrutto intermedio pcDNAVifOrf-A, mediante ligazione del vettore pcDNA3.1 con l'inserto *vif-orf-A*, estratto dal plasmide pΔLTR; (B) del plasmide mutante pΔLTRorfAStopΔpol, originato mediante ligazione del frammento *vif-orf-AStop*, recante la mutazione di interesse, con il frammento pΔLTRΔpol,vif,orfA, ottenuto nella precedente fase di clonaggio estratto dal plasmide pΔLTR e (C) del plasmide finale mutante pΔLTRorfASTOP, generato mediante ligazione del costrutto intermedio pΔLTRorfAStopΔpol, ottenuto nella precedente fase di clonaggio, con il frammento del gene *pol*, estratto dal plasmide pΔLTR. Gag: porzione della ORF del gene *gag*; pol: ORF del gene *pol*; Vif, Orf-A, Rev: ORFs minori di FIV rappresentanti i geni *vif*, *orf-A* e *rev*; env: ORF del gene *env*; pCMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-poly-A: segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina; Neo^R: gene per la resistenza alla neomicina.

5.11.4 Ottenimento del plasmide p Δ LTROrfAStopEnvFR1

E' stato generato un ulteriore costrutto, p Δ LTROrfAStopEnvFr1, che combina le mutazioni precedentemente descritte a livello di Env (Paragrafo 5.11.2) e di Orf-A (Paragrafo 5.11.3). Mediante specifiche endonucleasi di restrizione e l'allestimento di opportune reazioni di ligazione, a partire dal costrutto p Δ LTROrfAStop, è stato estratto il frammento genico *env-bgh wild type* (3060 pb) ed è stato sostituito con la medesima controparte mutata ottenuta da p Δ LTREnvFr1. Il costrutto ottenuto è stato controllato mediante restrizione enzimatica e sequenziato per valutare la presenza della mutazione desiderata nella regione *env* e *orf-A* e il corretto orientamento dell'inserto.

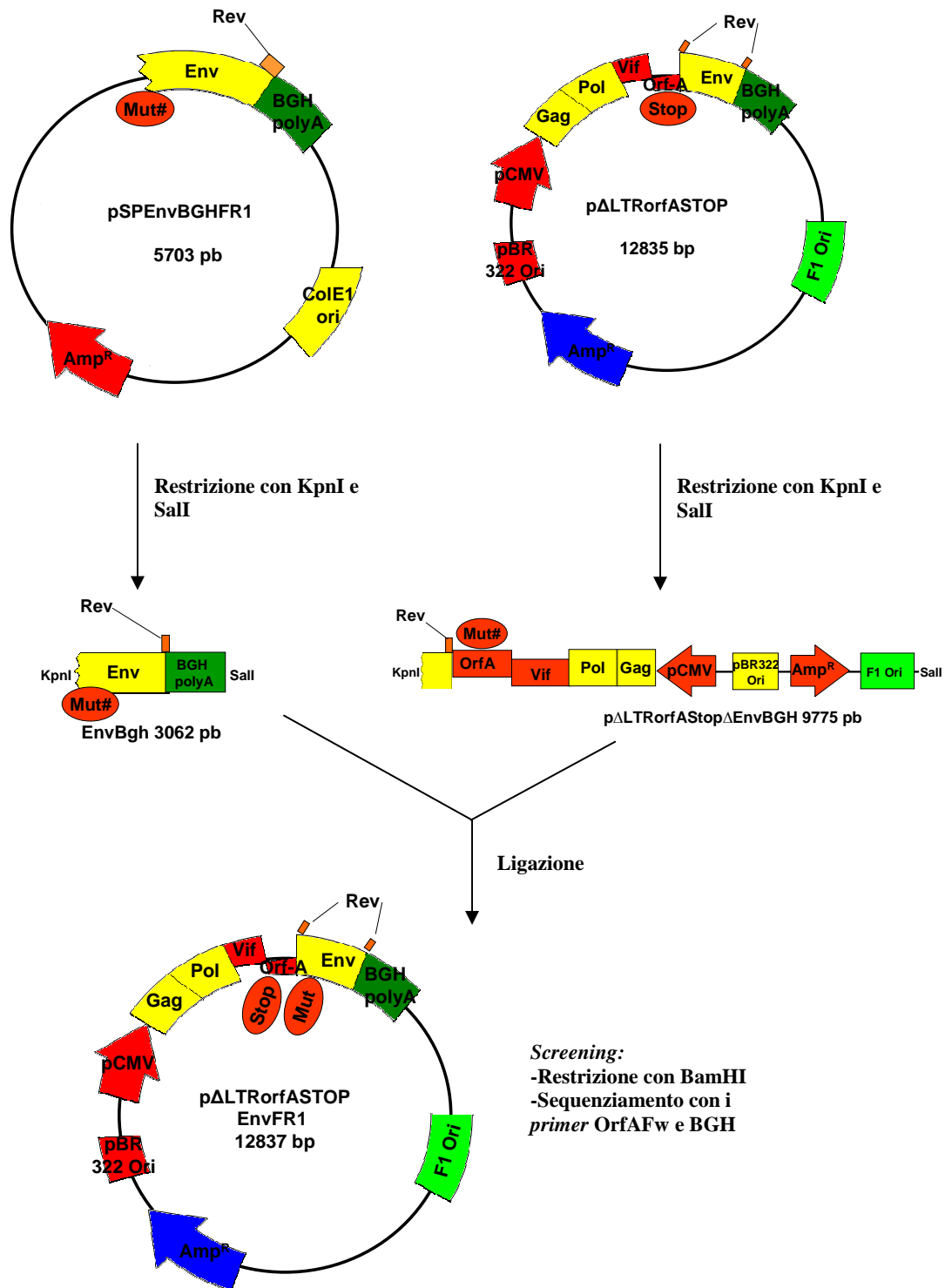


Figura 5.4: Rappresentazione schematica dell'ottenimento del plasmide mutante pΔLTRorfAStopEnvFR1, mediante ligazione del frammento *env-bghFR1* recante la mutazione di interesse, estratto dal plasmide pΔLTREnvFR1, con il frammento pΔLTRorfAStopΔEnvBGH, ottenuto mediante estrazione dal plasmide pΔLTRorfAStop. Gag: porzione della ORF del gene *gag*; pol: ORF del gene *pol*; Vif, Orf-A, Rev: ORFs minori di FIV rappresentanti i geni *vif*, *orf-A* e *rev*; env: ORF del gene *env*; pCMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-poly-A: segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina.

5.11.5 Ottenimento dei plasmidi esprimenti teterina umana e felina

L'mRNA estratto dalle cellule HeLa e CrFK è stato retrotrascritto (Paragrafo 5.8) e in seguito amplificato attraverso reazione di PCR (Paragrafo 5.9) mediante gli opportuni *primer* (Tabella 5.1) per ottenere rispettivamente la forma umana e felina di teterina priva di epitopo (felina: cBST-2FW e 3'cBST2-RV; felina priva del segnale di addizione del glicosilfosfatidilinositolo: cBST-2FW e cBST-2RV; e umana: hBST-2FW e hBST-2RV) e con l'epitopo FLAG in porzione aminotermine (felina: cBST-2FlagFW e 3'cBST2-RV; felina priva del segnale di addizione del glicosilfosfatidilinositolo cBST-2FlagFW e cBST-2RV; umana: hBST-2FlagFW e hBST-2RV).

In seguito, il prodotto di amplificazione mediante PCR è stato clonato nel vettore pCR[®]2.1-TOPO[®]. I plasmidi così ottenuti sono stati denominati: pTopohBST2, contenente la forma umana di teterina; pTopohBST2Flag5', contenente la forma umana di teterina con l'epitopo Flag nella regione aminotermine della proteina; pTopocBST2, contenente la forma felina di teterina; pTopocBST2Flag5', contenente la forma felina di teterina con l'epitopo Flag nella regione aminotermine della proteina; pTopocBST2ΔGPI, contenente la forma felina di teterina priva della regione contenente il segnale per l'addizione del glicosilfosfatidilinositolo; e pTopocBST2ΔGPIFlag5', contenente la forma felina di teterina priva della regione contenente il segnale per l'addizione del glicosilfosfatidilinositolo e con l'epitopo Flag nella regione aminotermine della proteina. I costrutti ottenuti sono stati verificati mediante restrizione enzimatica e sequenziati con i *primer* M13F e M13R (Tabella 5.1).

Il frammento genico di BST2 di interesse, in seguito, è stato inserito nel plasmide pCDNA3.1+, che dispone di tutti gli elementi necessari per l'espressione di geni in cellule eucariotiche, mediante specifiche endonucleasi di restrizione e l'allestimento di opportune reazioni di ligazione. I costrutti ottenuti sono stati controllati mediante restrizione enzimatica e sequenziato con *primer* T7 e BGH (Tabella 5.1). I plasmidi così ottenuti sono stati denominati hBST2, hBST2Flag5', cBST2, cBST2Flag5', cBST2ΔGPI e cBST2ΔGPIFlag5'.

A

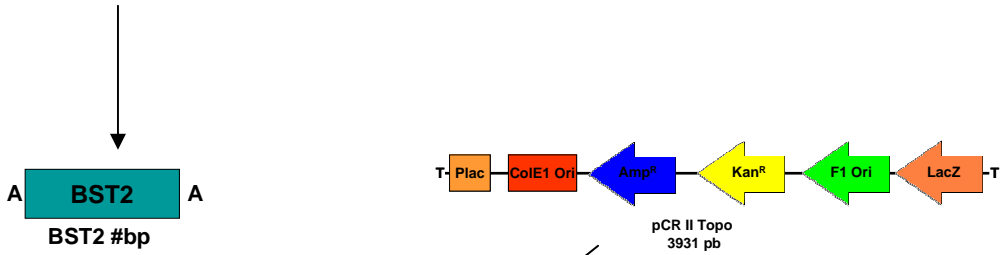
ESTRAZIONE mRNA TOTALE



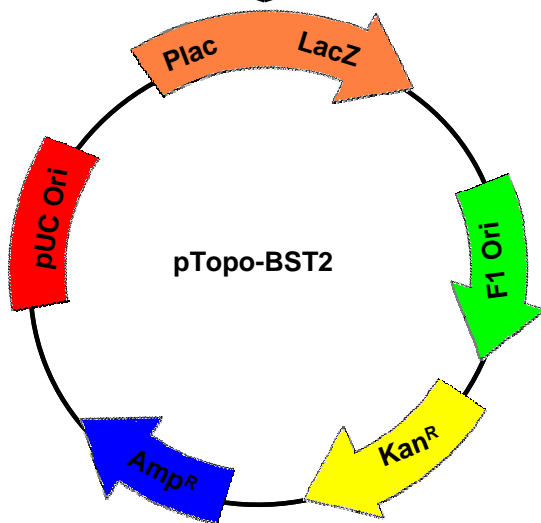
RETROTRASCRIZIONE



AMPLIFICAZIONE MEDIANTE
PCR CON GLI OPPORTUNI PRIMER



Reazione di clonaggio



Screening:
-Restrizione con EcoRI
-Sequenziamento con i
primer M13F e M13R

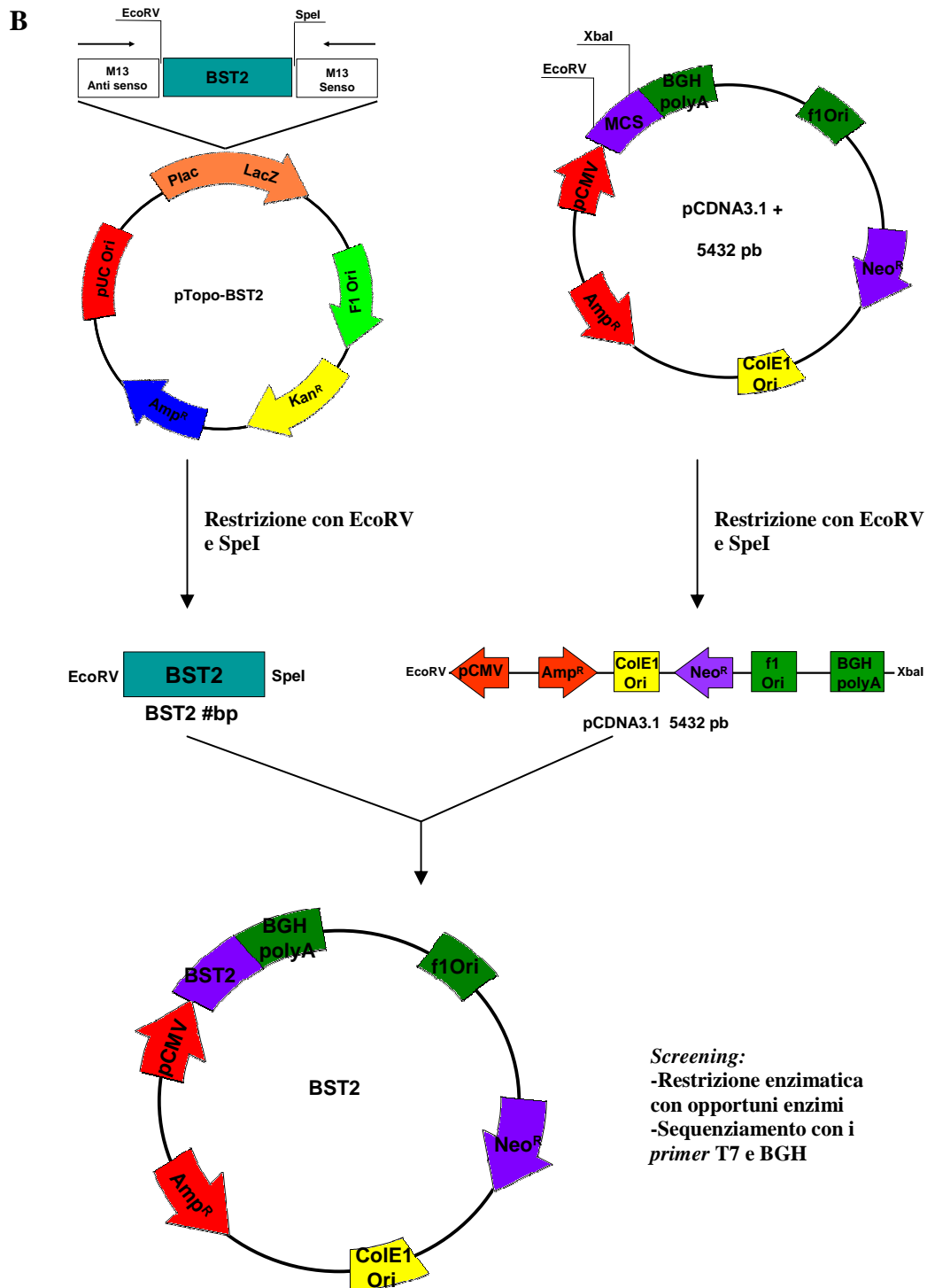
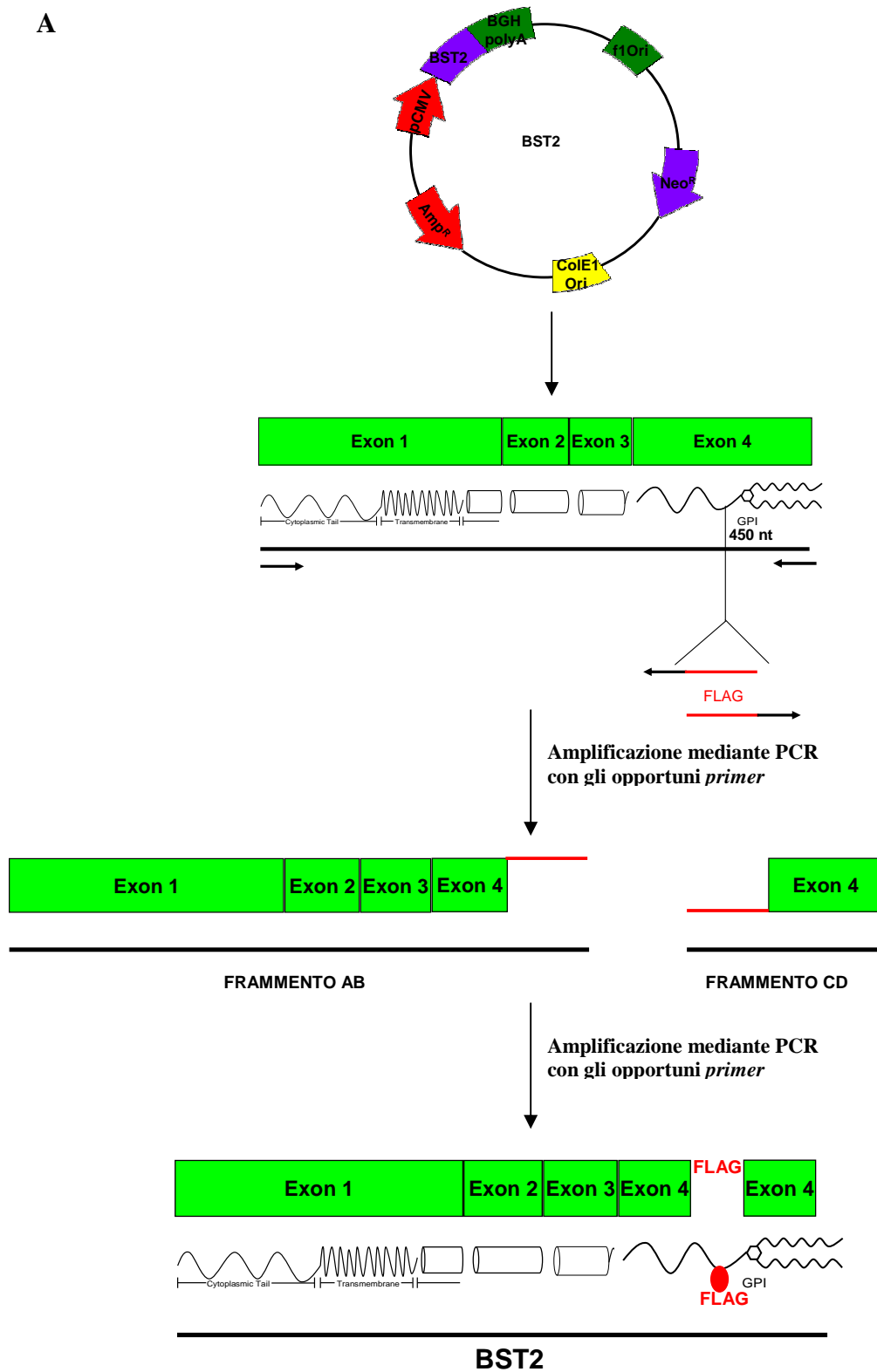


Figura 5.5: Rappresentazione schematica dell'ottenimento del costrutto intermedio pTopoBST2, mediante ligazione del vettore pCR®2.1-TOPO®, con l'inserto *bst2* (A), e di quello del plasmide mutante BST2, mediante ligazione del frammento *bst2* e del vettore pCDNA3.1+ (B). *Bst2*: contiene il gene *bst2* umano, felino oppure felino privo dell'ancora glicosilfosfatidilinositolo; Plac: promotore lac; LacZ: gene codificante i primi 146 amminoacidi del gene della β -galattosidasi di *E.coli*; M13 Anti-senso e senso: siti di legame per i primer M13; pb: paia di basi. CMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-poly-A: segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina; Neo^R: gene per la resistenza alla neomicina.

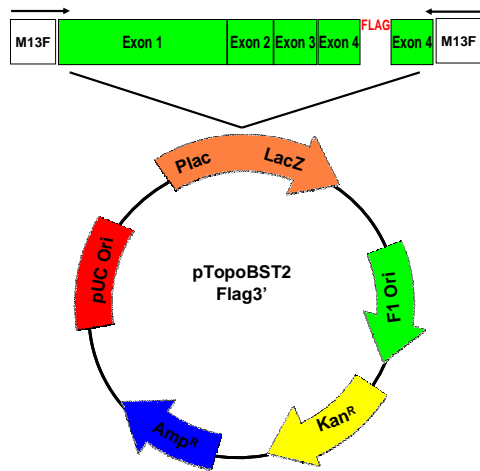
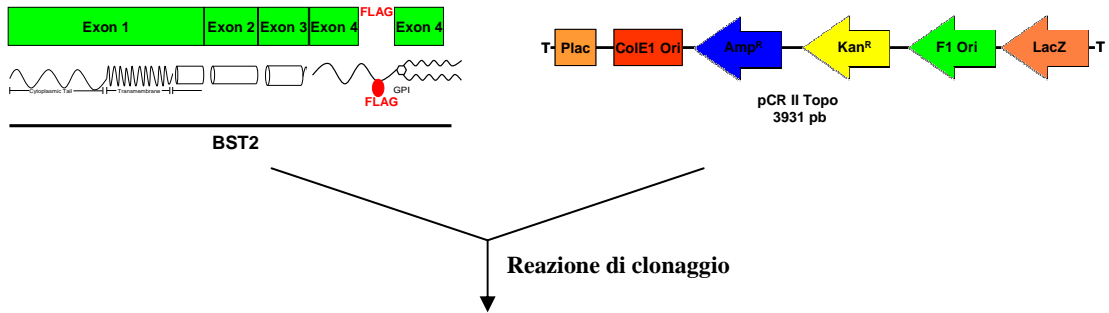
L'inserimento dell'epitopo Flag a valle del dominio extracellulare (*ectodomain*) nella forma umana, felina e felina priva di ancora GPI di teterina è stato ottenuto mediante tecnica PCR SOE (Horton *et al.*, 1989) (Figura 5.6). In particolare, a partire dai plasmidi codificanti la forma umana e felina di teterina, mediante successive reazioni di PCR (Paragrafo 5.9) con gli opportuni *primer* (Tabella 5.1), sono stati generati inizialmente il frammento AB (felina: cBST-2FW e cBST2bRV; felina priva del segnale di addizione del glicosilfosfatidilinositolo cBST-2FW e cBST2bRW; e umana: hBST-2FW e hBST2bRV) e il frammento CD (felina: cBST2cFW e 3'cBST-2; e umana: hBST2cFW e hBST-2RV). In seguito, mediante una successiva reazione di PCR, sfruttando gli amplificati AB e CD come stampo è stato ottenuto il frammento finale con l'epitopo FLAG nella posizione desiderata che è stato successivamente clonato nel vettore pCR[®]2.1-TOPO[®]. I plasmidi così ottenuti sono stati denominati: pTopohBST2Flag3', contenente la forma umana di teterina; pTopocBST2Flag3', contenente la forma felina di teterina; e pTopocBST2ΔGPIFlag3', contenente la forma felina di teterina priva del segnale per l'addizione del glicosilfosfatidilinositolo con l'epitopo Flag nella regione extracellulare della proteina. I costrutti ottenuti sono stati controllati mediante restrizione enzimatica e sequenziati con i *primer* M13F e M13R (Tabella 5.1).

Il frammento genico di BST2 di interesse, in seguito, è stato inserito nel plasmide pCDNA3.1+, che dispone di tutti gli elementi necessari per l'espressione di geni in cellule eucariotiche, mediante specifiche endonucleasi di restrizione e l'allestimento di opportune reazioni di ligazione. I costrutti ottenuti sono stati controllati mediante restrizione enzimatica e sequenziati con primer T7 e BGH (Tabella 5.1). I plasmidi ottenuti sono stati denominati hBST2Flag3', cBST2Flag3' e cBST2ΔGPIFlag3'.

A



B



Screening:
 -Restrizione con EcoRI
 -Sequenziamento con i primer M13F e M13R

C

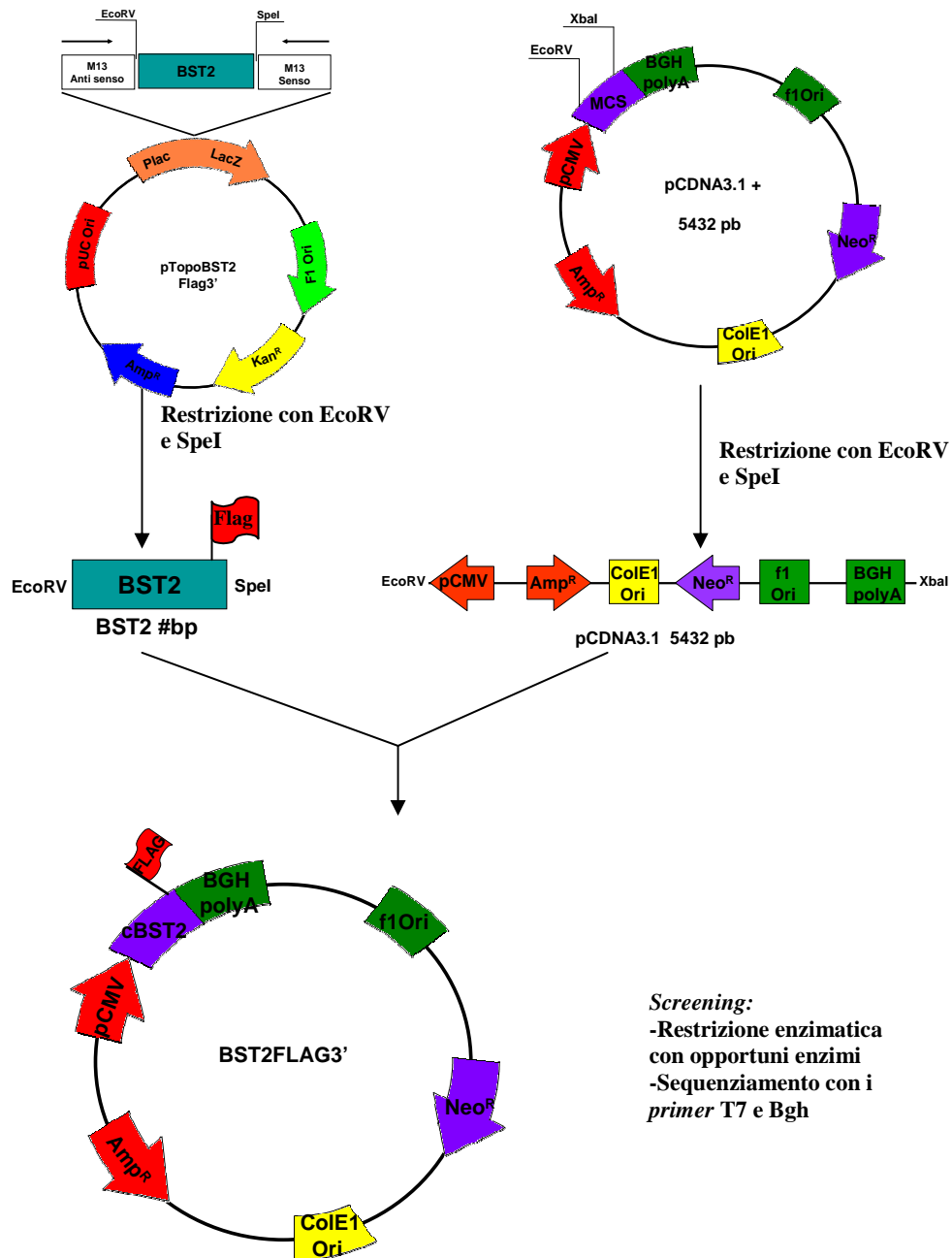


Figura 5.6: Rappresentazione schematica dell'ottenimento del costrutto intermedio pTopoBST2Flag3', mediante successive PCR (a), il frammento contenente il gene *bst2* con l'epitopo Flag in posizione carbossiterminale, è stato inserito mediante ligazione del vettore pCR®2.1-TOPO® (b), e di quello del plasmide BST2Flag3', mediante ligazione del frammento *bst2* e del vettore pCDNA3.1+ (c). Bst2: contiene il gene *bst2* umano, felino oppure felino privo dell'ancora glicosilfosfatidilinositolo con l'epitopo Flag nella regione extracellulare; Plac: promotore lac; LacZ: gene codificante i primi 146 amminoacidi del gene della β -galattosidasi di *E.coli*; M13 Anti-senso e senso: siti di legame per i primer M13; pb: paia di basi. CMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-poly-A: segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina; Neo^R: gene per la resistenza alla neomicina.

5.12 Sequenziamento dei plasmidi

Oltre all'analisi mediante restrizione enzimatica, i costrutti ottenuti in questo lavoro sono stati controllati tramite sequenziamento. A tal fine, è stato utilizzato il kit "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystem), basato sul metodo di Sanger modificato (Sanger *et al.*, 1977), in cui si utilizza la DNA polimerasi AmpliTaq® per sintetizzare copie di DNA a singolo filamento. Nella miscela di reazione, oltre ai quattro deossinucleotidi trifosfato (dNTPs), è stata aggiunta una miscela di dideossinucleotidi trifosfato (ddNTPs), ognuno dei quali è coniugato ad un diverso cromoforo. Tali gruppi, legati ai ddNTPs per non interferire stericamente con la reazione di polimerizzazione, quando eccitati alla stessa lunghezza d'onda di 448 nm, sono in grado di emettere fluorescenza a lunghezze d'onda diverse comprese tra 500 nm e 700 nm. Si ottiene così una serie di filamenti di DNA di sequenza complementare allo stampo, interrotti in punti casuali dai ddNTPs fluorescenti. I diversi frammenti vengono quindi separati per gel elettroforesi capillare e rilevando la lunghezza d'onda di emissione associate ai diversi dideossinucleotidi è possibile ricostruire la sequenza del DNA in analisi. La reazione di sintesi è stata allestita in un volume finale di reazione di 10 µl contenente: 300 ng di DNA estratto dalle preparazioni plasmidiche, il primer di innesco alla concentrazione 1 µM, 1 µl di buffer 5X (Tris-HCl 200 mM, pH 9, MgCl₂ 5 mM), 1 µl della miscela del kit e acqua milliQ per arrivare a volume. Come inneschi sono stati utilizzati opportuni oligonucleotidi riportati in Tabella 5.1.

Sono stati effettuati 35 cicli di amplificazione in termociclatore, comprendenti una fase di denaturazione a 95°C per 10 secondi, una fase di appaiamento degli oligonucleotidi a 50°C per 10 secondi e una fase di elongazione a 62°C per 4 minuti. Allo scopo di denaturare il DNA stampo e di attivare la polimerasi, i 35 cicli sono stati preceduti da un'incubazione delle miscele di reazione a 95°C per 10 minuti. I campioni sono stati mantenuti a 4°C fino al momento della purificazione. Il prodotto della reazione di sequenziamento 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.

L'elettroforesi capillare dei prodotti di estensione è stata eseguita nel sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem).

5.13 Tecniche di trasfezione

Nel presente lavoro sperimentale sono state impiegate due diverse metodiche per introdurre DNA esogeno all'interno delle cellule, in particolare la tecnica del calcio fosfato e la lipofezione.

Trasfezione con Calcio Fosfato: cellule 293T sono state seminate alla densità di 1.2×10^6 , in fiasche da 25 cm^2 di superficie (Falcon), in 4 ml di terreno DMEM completo, 24 ore prima della trasfezione. Il giorno successivo le cellule sono state trasfettate secondo le seguenti modalità:

- ✓ trasfezione del costrutto p Δ env1 o dei costrutti mutanti da esso derivati precedentemente descritti:

p Δ env1 o p Δ env1Mutante	1.25 μg
pBluescript [®] II KS(+)	2 μg
CaCl ₂	250 mM
TE 1/10 [diluizione 1:10 di TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8]	A volume fino a 160 μl

Tabella 5.2: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la trasfezione di cellule 293T con il plasmide p Δ env1 o con i costrutti mutanti da esso derivati.

- ✓ cotrasfezione del costrutto p Δ env1 o dei costrutti mutanti da esso derivati con il plasmide esprime la proteina Vps4 *wild type* o mutata (E228Q):

p Δ env1 o p Δ env1Mutante	1.25 μg
pBJ5, pBJ5Vps4Flag o pBJ5Vps4 ^{E228Q} Flag	2 μg
CaCl ₂	250 mM
TE 1/10 [diluizione 1:10 di TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8]	A volume fino a 160 μl

Tabella 5.3: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la cotrasfezione di cellule 293T con il plasmide p Δ env1 o con i costrutti mutanti da esso derivati e con il plasmide esprime la proteina pBJ5Vps4Flag o pBJ5Vps4E²²⁸QFlag.

- ✓ cotrasfezione del costrutto pΔenv1 o dei costrutti mutanti da esso derivati con il plasmide esprimente la proteina Ubiquitina:

pΔenv1 o pΔenv1Mutante	1.25 µg
pBJ5 o pBJ5UbHA	2 µg
CaCl ₂	250 mM
TE 1/10 [diluizione 1:10 di TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8]	A volume fino a 160 µl

Tabella 5.4: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la cotrasfezione di cellule 293T con il plasmide pΔenv1 o con i costrutti mutanti da esso derivati e con il plasmide esprimente la proteina Ubiquitina.

- ✓ cotrasfezione del costrutto pΔenv1 o dei costrutti mutanti da esso derivati con il plasmide esprimente la proteina AIP1/Alix:

pΔenv1 o pΔenv1Mutante	1.25 µg
pBJ5 o pBJ5-AIP1HA	2 µg
CaCl ₂	250 mM
TE 1/10 [diluizione 1:10 di TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8]	A volume fino a 160 µl

Tabella 5.5: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la cotrasfezione di cellule 293T con il plasmide pΔenv1 o con i costrutti mutanti da esso derivati e con il plasmide esprimente la proteina AIP1/Alix.

- ✓ cotrasfezione del costrutto pSVC21 o pSVC21Vpu⁺:

pSVC21 o pSVC21Vpu ⁺	1.25 µg
pCDNA3.1(+)	2 µg
CaCl ₂	250 mM
TE 1/10 [diluizione 1:10 di TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8]	A volume fino a 160 µl

Tabella 5.6: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la trasfezione di cellule 293T con il plasmide pSVC21 o pSVC21Vpu⁺.

- ✓ cotrasfezione del costrutto pSVC21 o pSVC21Vpu⁺ con i plasmidi esprimenti la forma umana o felina della proteina BST2:

pSVC21 o pSVC21Vpu ⁺	1.25 µg
hBST2/cBST2/cBST2ΔGPI con l'epitopo FLAG in diverse posizioni della proteina (5' o 3')	1.5 µg
pCDNA3.1(+)	0.5 µg
CaCl ₂	250 mM
TE 1/10 [diluizione 1:10 di TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8]	A volume fino a 160 µl

Tabella 5.7: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la trasfezione di cellule 293T con il plasmide pSVC21 o pSVC21Vpu⁺ e con i plasmidi esprimenti la forma umana o felina della proteina BST2.

- ✓ cotrasfezione del costrutto pΔLTR, pΔLTREnvFR1, pΔLTROrfAStop o pΔLTROrfAStopEnvFR1:

pΔLTR, pΔLTREnvFR1, pΔLTROrfAStop o pΔLTROrfAStopEnvFR1	1.25 µg
pCDNA3.1(+)	2 µg
CaCl ₂	250 mM
TE 1/10 [diluizione 1:10 di TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8]	A volume fino a 160 µl

Tabella 5.8: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la trasfezione di cellule 293T con il plasmide pΔLTR, pΔLTREnvFR1, pΔLTROrfAStop o pΔLTROrfAStopEnvFR1.

- ✓ cotrasfezione del costrutto pΔLTR, pΔLTREnvFR1, pΔLTROrfAStop o pΔLTROrfAStopEnvFR1 con i plasmidi esprimenti la forma umana o felina della proteina BST2:

pΔLTR, pΔLTREnvFR1, pΔLTROrfAStop o pΔLTROrfAStopEnvFR1	1.25 µg
hBST2/cBST2/cBST2ΔGPI con l'epitopo FLAG in diverse posizioni della proteina (5' o 3')	1.5 µg
pCDNA3.1(+)	0.5 µg
CaCl ₂	250 mM
TE 1/10 [diluizione 1:10 di TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8]	A volume fino a 160 µl

Tabella 5.9: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la trasfezione di cellule 293T con il plasmide pΔLTR, pΔLTREnvFR1, pΔLTROrfAStop o pΔLTROrfAStopEnvFR1 e con i plasmidi esprimenti la forma umana o felina della proteina BST2.

Alle soluzioni costituite da DNA risospeso in TE 1/10 e CaCl₂ sono stati aggiunti 160 µl del tampone HPB2X pH 7.1 [NaCl 280 mM, HEPES 50 mM pH 7.1, Na₂HPO₄ 1.5 mM] e, dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, la sospensione è stata trasferita nel mezzo di coltura delle cellule. Sei ore dopo la trasfezione, le cellule sono state sottoposte a 2 lavaggi con terreno DMEM completo e, infine, incubate con 7 ml di terreno DMEM completo. La raccolta delle cellule trasfettate e dei relativi mezzi di coltura è stata effettuata 24 ore dopo la trasfezione.

Negli esperimenti di trasfezione di cellule 293T svolti al fine di indagare l'incorporazione della proteina AIP1/Alix nelle VLPs, sono state apportate alcune variazioni al protocollo di trasfezione precedentemente descritto. In particolare, le cellule 293T sono state seminate alla densità di 4.5×10^6 , in fiasche da 75 cm² di superficie (Falcon), in 11 ml di terreno DMEM completo, 24 ore prima della trasfezione. Il giorno successivo le cellule sono state trasfettate secondo la seguente modalità, in triplice copia per ogni costrutto analizzato:

- ✓ cotrasfezione dei costrutti derivati da pΔenv1 non esprimenti la proteasi di FIV con il vettore di espressione della proteina AIP1/Alix:

pΔenv1Mutante+6	10 µg
pBJ5 o pBJ5-AIP1HA	5 µg
CaCl ₂	250 mM
TE 1/10 [diluizione 1:10 di TE: Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8]	A volume fino a 450 µl

Tabella 5.10: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la cotrasfezione delle cellule 293T con i costrutti derivati da pΔenv1 non esprimenti la proteasi di FIV e con il vettore di espressione della proteina AIP1/Alix, allo scopo di indagare l'incorporazione della proteina cellulare nelle particelle simil-virali.

Alle soluzioni costituite da DNA risospeso in TE 1/10 e CaCl₂ sono stati aggiunti 500 µl del tampone HPB2X pH 7.1 e, dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, la sospensione è stata trasferita nel mezzo di coltura delle cellule. Sei ore dopo la trasfezione, le cellule sono state sottoposte a 2 lavaggi con terreno DMEM completo e, infine, incubate con 12 ml di terreno DMEM completo. La raccolta delle cellule trasfettate e dei relativi mezzi di coltura è stata effettuata 36 ore dopo la trasfezione.

Trasfezione con liposomi: tecnica di trasferimento genico mediata da liposomi.

Le cellule 293T sono state seminate alla densità di 1.2×10^6 , in fiasche da 25 cm² di superficie (Falcon), in 5 ml di terreno DMEM privo di antibiotici, contenente 10% (v/v) di FCS, 24 ore prima della lipofezione in modo tale da raggiungere una confluenza ottimale del 90-95%. Il giorno seguente, le cellule sono state trasfettate con i plasmidi esprimenti la forma umana o felina della proteina BST2:

hBST2/cBST2/cBST2ΔGPI con l'epitopo FLAG in diverse posizioni della proteina (5' o 3')	1.5 µg
pCDNA3.1(+)	6.5 µg
DMEM <i>serum free</i>	A volume fino a 500 µl

Tabella 5.11: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la trasfezione di cellule 293T con i plasmidi esprimenti la forma umana o felina della proteina BST2.

Alle soluzioni costituite da DNA risospeso sono stati aggiunti quindi 20 µl di Lipofectamine 2000 (1 mg/ml, Invitrogen), secondo le indicazioni del produttore. Dopo 6 ore il terreno è stato sostituito con terreno di coltura completo fresco in

modo da limitare l'effetto citotossico dei liposomi senza diminuire l'efficienza di trasfezione. La raccolta delle cellule trasfettate e dei relativi mezzi di coltura è stata effettuata 24 ore dopo la trasfezione

Per gli esperimenti di immunofluorescenza le cellule 293T (3.5×10^5 cellule) sono state seminate 24 ore prima della trasfezione su appositi vetrini, collocati in 6-well da 1.6 cm^2 di superficie per pozzetto (Falcon), in 2 ml di terreno DMEM completo privo di antibiotici, contenente 10% (v/v) di FCS. Il giorno seguente, le cellule sono state trasfettate con i plasmidi esprimenti la forma umana o felina della proteina BST2:

hBST2FLAG3' o cBST2FLAG3'	4 μg
DMEM <i>serum free</i>	A volume fino a 250 μl

Tabella 5.12: schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la trasfezione di cellule 293T con i plasmidi esprimenti la forma umana o felina della proteina BST2.

Alle soluzioni costituite da DNA risospeso sono stati aggiunti quindi 10 μl di Lipofectamine 2000 (1 mg/ml, Invitrogen), secondo le indicazioni del produttore. La raccolta delle cellule trasfettate è stata effettuata 24 ore dopo la trasfezione.

5.14 Immunofluorescenza

Le cellule 293T sono state piastrate su vetrini coprioggetto da immunocitochimica pretrattati con una soluzione di Poli-Lisina (0.1 mg/ml, Sigma) ad una densità di 3.5×10^5 cellule. Dopo 24 ore dalla trasfezione (si veda paragrafo 5.13), le cellule sono state lavate con tampone fosfato [PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, pH 7.4] e sono state fissate 20 minuti a temperatura ambiente con paraformaldeide (PFA) al 2% in tampone fosfato.

In seguito le cellule sono state incubate per 30 minuti a temperatura ambiente in soluzione di bloccaggio [BSA (*Bovine Serum Albumine*) 3% in tampone fosfato]. Successivamente, le cellule sono state incubate per una notte a 4°C con l'anticorpo monoclonale di topo anti-Flag (Sigma) diluito 1:200. I campioni sono stati quindi lavati con tampone fosfato ed incubati per un'ora a 37°C con le immunoglobuline di pecora antitopo coniugato a fluoresceina isotiocianato (FITC) (Santacruz Biotechnology) diluito 1:100. Dopo tre lavaggi in tampone fosfato ed uno in acqua distillata, i vetrini sono stati montati su vetrino portaoggetti, su cui era stata precedentemente aggiunta una goccia di soluzione di montaggio [glicerolo 90% (v/v) in PBS, N-propilgallato 0.2% (p/v)] (Vectashield H-100,

Vector Laboratories) e analizzati al microscopio confocale con obiettivo 63C ad immersione (LEICA DM IRBE).

5.15 Produzione di virus-like particles (VLPs) e di virioni

L'espressione della sola poliproteina Gag di FIV (Pr50^{Gag}) è sufficiente per guidare l'assemblaggio ed il rilascio di particelle simil-virali (VLPs) non infettive e immature (Gottlinger *et al.*, 1991, Luttge *et al.*, 2008, Calistri *et al.*, 2009b).

Nel presente lavoro, attraverso la trasfezione di cellule della linea 293T sono state ottenute VLPs con il plasmide p Δ env1 o con i costrutti da esso derivati; oppure sono stati prodotti virioni completi a partire da costrutti HIV-1- o FIV-basati (Paragrafo 5.13).

La raccolta del mezzo di coltura, nel quale vengono rilasciati i virioni o le VLPs, è stata effettuata 24 ore dopo la trasfezione. Il terreno è stato raccolto in tubi da centrifuga (Falcon) da 15 ml e sottoposto a centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti a 4°C, al fine di sedimentare i detriti cellulari in esso presenti. Il surnatante è stato successivamente filtrato (0.45 μ m, Millipore).

Nel caso in cui gli esperimenti di trasfezione fossero finalizzati alla rilevazione dell'incorporazione della proteina AIP1/Alix nelle VLPs, i mezzi di coltura contenenti le VLPs sono stati raccolti 36 ore dopo la trasfezione in tubi da centrifuga (Falcon) da 50 ml, nei quali sono stati riuniti i terreni derivanti dalle tre copie ripetute della medesima trasfezione. Questo passaggio, unitamente alla trasfezione di un maggior numero di cellule rispetto al protocollo di trasfezione che non prevede l'analisi dell'incorporazione di proteine cellulari nelle VLPs, ha consentito di aumentare la concentrazione di VLPs nel mezzo di coltura, rendendo possibile l'eventuale individuazione di AIP1/Alix in esse incorporata. I mezzi di coltura raccolti sono stati, infine, centrifugati, filtrati e conservati secondo le modalità precedentemente descritte.

5.16 Purificazione delle VLPs mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio (virion pelleting)

I virioni e le VLPs, ottenute come descritto nel Paragrafo 5.15, sono state purificate dal mezzo di coltura mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio. La tecnica prevede la stratificazione dell'intero volume di surnatante contenente le VLPs su una soluzione di 4 ml di saccarosio al 20% (p/v) in tubi da centrifuga (*Polyallomer Centrifuge Tubes* 14 x 89 mm, Beckman), che vengono, in seguito,

sottoposti a centrifugazione a 27000 rpm per 2 ore a 4°C. Dopo eliminazione del terreno di coltura e dello strato di saccarosio mediante aspirazione, il sedimento virale è stato risospeso in 35 µl di RIPA 1X [NaCl 150 mM, IGEPAL CA-630 1% (v/v) (Sigma), acido deossicolico 0.5% (p/v), SDS 1% (p/v) (Bio-Rad), Tris-HCl 50 mM pH 8.0] e sottoposto a SDS-PAGE (Paragrafo 5.18).

Nel caso in cui i mezzi di coltura contenenti le VLPs fossero stati ottenuti in seguito alla trasfezione condotta secondo il protocollo volto alla rilevazione dell'incorporazione di AIP1/Alix, un volume di terreno pari a 10.5 ml è stato stratificato su una soluzione di 6 ml di saccarosio al 20% (p/v) in tubi da centrifuga (*Polyallomer Centrifuge Tubes* 25 x 89 mm, Beckman), sottoposti, poi, a centrifugazione a 27000 rpm per 2 ore a 4°C. Dopo eliminazione del terreno di coltura e dello strato di saccarosio, il sedimento virale è stato risospeso in 50 µl di RIPA 1X e sottoposto a SDS-PAGE (Paragrafo 5.18).

5.17 Preparazione dei lisati cellulari

Le cellule trasfettate sono state staccate dal piatto di coltura con tripsina e lavate dal terreno di coltura per 3 volte con tampone fosfato [PBS: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4] freddo, mediante centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti. In seguito, le cellule sono state lisate tramite risospensione in 350 µl di soluzione di lisi [RIPA 1X con l'aggiunta della miscela di inibitori delle proteasi *Complete* 1X (Estratto di pancreas, Pronasi, Termolisina, Chimotripsina, Tripsina, Papaina) (Roche/Boehringer)] ed incubate per 30 minuti a 4°C. In questo modo si favorisce la lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine, bloccando l'attività delle proteasi intracellulari che, una volta rilasciate, potrebbero degradare le proteine di interesse. I campioni sono stati successivamente centrifugati a 13000 rpm per 30 minuti a 4°C, al fine di separare le proteine in soluzione dai detriti cellulari. Il surnatante ottenuto è stato sottoposto a corsa elettroforetica denaturante in gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) (Paragrafo 5.18).

5.18 Elettroforesi di proteine denaturante (SDS-PAGE)

Le proteine contenute nelle VLPs, nei virioni e nei lisati cellulari (Paragrafi 5.16 e 5.17) sono state analizzate mediante corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti e successivo Western Blotting. I campioni sono stati diluiti nel tampone di caricamento Laemmli *Buffer* 2X [Tris-HCl 100 mM pH 6.8,

SDS 4% (p/v), glicerolo 20% (p/v), blu di bromofenolo 0.2% (p/v), DTT 200 mM, in presenza o meno di β -mercaptoetanolo 5%] e bolliti a 100°C per 5 minuti, prima di essere caricati in gel. Al fine di verificare la corretta dimensione delle proteine di interesse, è stato impiegato il marcatore di peso molecolare *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas; proteine 170/130/95/72/55/43/34/ 26/17 kDa).

La corsa elettroforetica dei campioni è avvenuta in gel di poliacrilamide delle dimensioni di 200 x 200 mm e dello spessore di 1 mm o in minigel delle dimensioni di 60 x 80 mm e dello spessore di 1.5 mm, preparati come da ricetta:

- ✓ Gel di concentrazione (*stacking gel*) al 4.5% (p/v) di acrilammide, 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 μ l di SDS 10% (p/v) (Bio-Rad), 20 μ l di N,N,N,N',N'-tetrametiletilenediammina, TEMED (Bio-Rad), 80 μ l di ammonio persolfato (APS) 10% (p/v) (Bio-Rad) e portato al volume finale di 16 ml con acqua deionizzata.
- ✓ Gel di separazione (*separating gel*) al 10% (p/v) di acrilammide, costituito da 12.5 ml di Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, 16.6 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v) (Bio-Rad), 500 μ l di SDS 10% (p/v) (Bio-Rad), 40 μ l di TEMED (Bio-Rad), 200 μ l di APS 10% (p/v) (Bio-Rad) e portato al volume finale di 50 ml con acqua deionizzata.

La migrazione elettroforetica è stata effettuata con un'intensità di corrente costante (80V per circa 12 ore, nel caso dei gel delle dimensioni di 200 x 200 mm; 90V per 2 ore e 30 minuti, nel caso di minigel), in presenza di un tampone di corsa [Tris 0.25 M (Bio-Rad), glicina 1.9 M (Bio-Rad), SDS 0.1% (p/v) (Bio-Rad) pH 9.2].

5.19 Western Blotting

Le proteine separate in gel di poliacrilamide, come descritto al paragrafo 5.18, sono state trasferite elettricamente su una membrana di nitrocellulosa (*PROTRAN[®] pure nitrocellulose transfer and immobilization membrane*, Whatman - PerkinElmer), utilizzando l'apparato per il trasferimento *Trans-Blot Cell* (Bio-Rad). Prima del trasferimento, la membrana ed il gel sono stati equilibrati per 30 minuti nell'appropriato tampone di trasferimento [Tris 0,25 M (Bio-Rad), glicina 1.9 M (Bio-Rad), metanolo 20% (v/v)]. Il trasferimento è stato condotto per 2 ore a temperatura ambiente, al voltaggio costante di 50 V. Successivamente, allo scopo di saturare i siti di legame aspecifici, la membrana è

stata incubata per un tempo minimo di 45 minuti in agitazione con una soluzione bloccante [latte scremato in polvere al 5% (p/v) (Bio-Rad) in tampone fosfato PBS + 0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma)]. In seguito la membrana è stata immersa in una soluzione contenente l'anticorpo primario specifico per le proteine oggetto di analisi ed incubata a 4°C per 16 ore circa in agitazione. Di seguito è riportata la Tabella 5.13 che riassume gli anticorpi impiegati e le loro modalità di utilizzo:

Anticorpo 1^{RO}	Diluizione di utilizzo	Soluzione saturante
Monoclonale di topo anti-p24Gag (FIV) (AbD Serotec)	1:1000	latte scremato 1 % (p/v)
Monoclonale di coniglio anti-p24Gag (HIV-1) (Advanced Biotechnologies)	1:1000	latte scremato 5 % (p/v)
Monoclonale di topo anti-HA (Covance)	1:2000	latte scremato 5 % (p/v)
Monoclonale di topo anti-Flag (Sigma)	1:2000	latte scremato 5 % (p/v)

Tabella 5.13: Anticorpi primari utilizzati e loro principali caratteristiche. In PBS 1X addizionato dello 0,1% (v/v) di Tween 20.

Dopo trattamento con l'anticorpo primario, la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno in PBS addizionato dello 0.1% (v/v) di Tween 20 e, in seguito, incubata per 1 ora con l'anticorpo secondario immunoglobuline di pecora antitopo o anticoniglio coniugate all'enzima perossidasi di rafano (HRP, *horseradish peroxidase*). Nel caso in cui l'anticorpo primario fosse anti-p24Gag di FIV, l'anticorpo secondario è stato diluito 1:1000 nella soluzione di latte scremato in polvere allo 0.5% (p/v) (Bio-Rad) in tampone fosfato PBS + 0.1% (v/v) Tween 20, mentre, nel caso in cui l'anticorpo primario fosse anti-HA o anti-FLAG, l'anticorpo secondario è stato diluito 1:2000 in latte scremato in polvere al 5% (p/v) in tampone fosfato PBS + 0.1% (v/v) Tween 20. Per l'anticorpo primario anti-p24Gag di HIV-1, l'anticorpo secondario anti-coniglio è stato diluito 1:2000 nella soluzione di latte scremato in polvere allo 5% (p/v). Dopo 3 ulteriori lavaggi, analoghi ai precedenti, la membrana è stata lavata per un'ultima volta solamente in PBS. Successivamente si è proceduto ad un'incubazione per 1 minuto con una soluzione contenente il substrato per la reazione chemiluminescente della perossidasi (*ECL Plus Western Blotting Detection system*, Amersham Bioscience) con cui sono state impressionate le lastre

fotografiche (*Biomax light film*, Kodak) sovrappo­nendole alla membrana. Le lastre sono state esposte alla membrana per un tempo variabile tra 30 secondi e 5 minuti e successivamente sviluppate mediante l'impiego dell'apparato *Hyper processor* (Amersham Biosciences).

6. RISULTATI

RUOLO DELLA REGIONE GAG DI FIV NELL'INTERAZIONE CON PROTEINE CELLULARI COINVOLTE NELLA GEMMAZIONE

Premessa

I virus a RNA dotati di *envelope* sfruttano organelli cellulari, i *multivesicular body* (MVB), per l'assemblaggio e la gemmazione. In generale i virus impiegano due strategie principali per dirottare il macchinario di biogenesi dei MVB: i) la monoubiquitinazione di specifiche proteine virali; e ii) la diretta interazione tra proteine cellulari dell'*Endosomal Complexes Required for Transport* (ESCRT) e corti motivi ricchi in prolina, detti domini tardivi, localizzati in diverse proteine virali strutturali. In particolare, sono stati identificati tre *late domain* e i loro rispettivi partner di legame all'interno del *pathway* di biogenesi dei MVB: i) il motivo PPxY che interagisce con le ubiquitino-ligasi della famiglia Nedd4-*like*; ii) il motivo P(T/S)AP che recluta la proteina tumor suppressor gene 101 (TSG101) ed iii) il motivo YPX_nL che contatta la proteina AIP1/Alix. Tuttavia, le specifiche interazioni virus/cellula e le necessità delle singole specie virali si differenziano nelle diverse famiglie virali, e a livello di virus di una stessa famiglia adattati a specie diverse (Calistri *et al.*, 2009b). Ci siamo proposti di analizzare in maggior dettaglio gli aspetti molecolari degli eventi tardivi della replicazione retrovirale, impiegando FIV come modello, concentrandoci sulla fase di assemblaggio/rilascio di particelle virali infettive.

L'espressione della poliproteina Gag, in assenza di ogni altra proteina virale, porta alla formazione di particelle simil-virali (VLPs) in grado di gemmare dalle cellule (Göttlinger *et al.*, 1991). Nello specifico, la poliproteina Gag di FIV è caratterizzata da un'elevata variabilità del peptide carbossiterminale p2, che corrisponde al p6 in HIV-1. Nonostante ciò, il dominio tardivo PSAP sembra essere altamente conservato (Manrique *et al.*, 2004). A partire da queste osservazioni, nel nostro laboratorio sono state prodotte una serie di chimere virali ingegnerizzando la poliproteina Gag di FIV a diversi livelli. In questo modo è stato possibile analizzare nello specifico il ruolo del dominio tardivo del virus nel corretto assemblaggio e rilascio delle particelle virali. E' stato inoltre caratterizzato l'impiego del *pathway* dei MVB nella gemmazione del virus andando ad analizzare, in particolare, il coinvolgimento della proteina AIP1/Alix nel rilascio delle VLPs e le regioni di Gag implicate nella sua putativa azione. Gli

esperimenti sono stati condotti su due linee cellulari e in particolare su cellule CrFK e cellule 293T. Le prime infatti, fibroblasti della porzione corticale del rene di gatto, derivano dall'ospite fisiologico di FIV e quindi rappresentano le cellule d'elezione per lo studio di questo virus. Le seconde, cellule embrionali di rene umano, sono state scelte in quanto vengono normalmente utilizzate per ottenere una elevata espressione di proteine. L'utilizzo di due linee cellulari di origine diversa ci permette inoltre di valutare eventuali fenomeni cellulo/specie-specifici.

6.1 Caratterizzazione dei domini tardivi della regione Gag di FIV

Con l'obiettivo di valutare il contributo del dominio PSAP nella gemmazione virale, a partire dal costrutto plasmidico p Δ env1 (considerato come costrutto *wild type* di riferimento, Tabella 6.1) codificante la regione Gag-Pol, sono stati ottenuti quattro costrutti, mediante mutagenesi sito-specifica, caratterizzati dalla sostituzione di uno (Mut01, ASAP) o di entrambi (Mut02, ASAA) i residui di prolina del motivo PSAP con alanina, in combinazione o meno con l'introduzione di un codone di stop al posto dell'amminoacido in posizione 10 della proteasi (Tabella 6.1).

	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450		
pΔenv1	P	S	A	P	P	M	E	E	K	L	L	D	L		PSAP-LLDL
pΔenv1Mut6	P	S	A	P	P	M	E	E	K	L	L	D	L	+STOP	PSAP-LLDL + STOP
pΔenv1Mut01	A	S	A	P	P	M	E	E	K	L	L	D	L		ASAP-LLDL
pΔenv1Mut01+6	A	S	A	P	P	M	E	E	K	L	L	D	L	+STOP	ASAP-LLDL + STOP
pΔenv1Mut02	A	S	A	A	P	M	E	E	K	L	L	D	L		ASAA-LLDL
pΔenv1Mut02+6	A	S	A	A	P	M	E	E	K	L	L	D	L	+STOP	ASAA-LLDL + STOP

Tabella 6.1: Schema delle mutazioni inserite a livello della regione p2 della poliproteina Gag di FIV. Il dominio tardivo PSAP è evidenziato in blu. Evidenziati in rosso i residui aminoacidici sostituiti. In alto sono indicate le posizioni aminoacidiche, considerando come 1 il primo residuo di Gag di FIV.

Al fine di valutare gli effetti delle mutazioni introdotte a livello del motivo PSAP sulla gemmazione virale, il DNA ricombinante relativo ai costrutti mutanti p Δ env1Mut01 (ASAP-LLDL) e p Δ env1Mut02 (ASAA-LLDL) è stato trasfettato sia in cellule 293T che CrFK. A distanza di 24 ore, le cellule sono state raccolte, lisate e le proteine estratte. I sovranatanti, invece, sono stati purificati su cuscino di saccarosio e trattati con opportuni buffer di lisi. I campioni proteici, così ottenuti, lisati cellulari e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting. L'impiego di un anticorpo diretto contro la proteina p24 di FIV, che riconosce in modo specifico questo

epitopo, permette di visualizzare tutte le proteine che contengono la suddetta sequenza aminoacidica, in particolare la proteina p24 (CA) stessa, l'intermedio di processamento p37 (CA-p1-NC-p2) ed il precursore Pr50^{Gag}. Come si può osservare in figura 1a (Capitolo 12) il mutante Mut02 (corsia 2 ASAA, VLPs, Figura 1a), che presenta la completa distruzione del dominio tardivo PSAP, porta ad una significativa inattivazione della funzionalità del motivo stesso indipendentemente dalla linea cellulare considerata. E' visibile, infatti, una drastica riduzione nelle VLPs sebbene la proteina Pr50 venga efficientemente prodotta e correttamente processata in modo paragonabile al *wild type*. Interessante osservare come, in contrasto con quanto avviene in HIV-1, la mutazione a livello della sola prima prolina di PSAP (ASAA) non sia sufficiente per compromettere il rilascio di particelle virali (corsia 1 ASAP, VLPs, Figura 1a, Capitolo 12). Infatti, nel caso del costrutto Mut01 le VLPs continuano a gemmare in modo paragonabile a quanto avviene per il costrutto pΔenv1. I nostri risultati dimostrano come il dominio tardivo PSAP sia essenziale per il rilascio delle particelle virali di FIV.

Si è voluto, successivamente, analizzare il comportamento dei mutanti Mut01 (ASAP-LLDL) e Mut02 (ASAA-LLDL) anche in assenza di proteasi attiva. Infatti, in HIV-1 è stato dimostrato come vi sia un legame funzionale tra la regione p6 ed il processamento proteolitico del precursore Gag nella fase di rilascio della progenie virale. In particolare, la mancanza di proteasi attiva porta ad un recupero della capacità di gemmare di costrutti difettivi a livello del dominio tardivo (Huang *et al.*, 1995). Allo scopo di verificare tale fenomeno in FIV, i costrutti mutanti pΔenv1Mut01+6 e pΔenv1Mut02+6 caratterizzati dalle mutazioni precedentemente descritte in combinazione con l'introduzione di un codone di stop al posto dell'aminoacido 10 della proteasi (indicato come +6), che porta alla mancata espressione della componente Pol della poliproteina Gag-Pol, sono stati trasfettati sia in cellule 293T che CrFK. A distanza di 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte e lisate per l'estrazione delle proteine, mentre i surnatanti, contenenti le VLPs, sono stati purificati su cuscino di saccarosio e, in seguito, lisati. I campioni proteici ottenuti dal processamento di cellule e surnatanti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e a successivo Western Blotting mediante l'impiego di un anticorpo diretto contro la proteina p24.

In contrasto con HIV-1, l'inattivazione del motivo PSAP ha un forte impatto anche nel contesto della proteasi inattiva (si veda Figura 1b, Capitolo 12). Infatti, il rilascio di VLPs da parte del campione relativo al mutante Mut02+6 (corsia 2 ASAP, VLPs, Figura 1b, Capitolo 12) viene quasi completamente inibito,

portando di conseguenza ad un accumulo intracellulare della proteina precursore Pr50.

Al fine di confermare il coinvolgimento del *pathway* dei MVB nella gemmazione di FIV, è stata utilizzata una forma dominante negativa (Vps4^{E228Q}) della proteina cellulare AAA ATPasi Vps4, essenziale per la biogenesi dei MVB. I dominanti negativi di questa proteina inibiscono la formazione delle vescicole che, gemmando sugli endosomi, portano alla formazione dei MVB ed inoltre sono in grado di arrestare il processo di gemmazione di virus recanti domini tardivi di classe diversa (Calistri *et al.*, 2009a). Il blocco del *pathway* dovuto a questi mutanti è quindi più generale rispetto a quello che si ottiene agendo sulle diverse proteine a monte, che interagiscono direttamente con i diversi domini tardivi finora caratterizzati. Cellule 293T e CrFK sono state pertanto trasfettate con i plasmidi pΔenv1 o pΔenv1Mut6 e con quelli esprimenti Vps4 nella forma *wild type* o caratterizzata dalla mutazione E228Q. A distanza di 24 ore i campioni proteici ottenuti, lisati cellulari e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting con anticorpo diretto contro la proteina p24 Gag. I risultati dimostrano un significativo blocco del rilascio di VLPs da parte delle cellule esprimenti Vps4^{E228Q}, sia nel caso delle 293T che delle CrFK, indipendentemente dalla funzionalità o meno della proteasi virale (Figura 2, Capitolo 12). Questi risultati dimostrano chiaramente che FIV utilizza il *pathway* dei MVB per gemmare dalla cellula ospite.

Studi riportati in letteratura hanno dimostrato la presenza di forme modificate di Gag nelle VLPs di diversi retrovirus e la loro correlazione con la funzionalità dei domini tardivi (Strack *et al.*, 2000). Come si può osservare nei risultati degli esperimenti prima descritti, anche nel caso delle VLPs di FIV prodotte dalla trasfezione di cellule CrFK e 293T, sono visibili bande di Gag ad alto peso molecolare, in particolare per i costrutti mutanti di FIV contenenti il codone di stop al posto dell'aminoacido 10 della proteasi, e di come esse siano correlate alla funzionalità del dominio tardivo. Al fine di confermare l'ipotesi che le forme di Gag a più alto peso molecolare rappresentino forme proteiche ubiquitinate, i costrutti pΔenv1Mut6 e pΔenv1Mut02+6 sono pertanto stati cotrasfettati con il plasmide pBJ5UbiHA, esprime monomeri di ubiquitina fusi con l'epitopo HA. Dopo 24 ore dalla trasfezione, i campioni proteici ottenuti, lisati cellulari e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting. L'impiego dell'anticorpo diretto contro la proteina p24 Gag ha reso possibile dimostrare che, anche in tale sistema di cotrasfezione, i mutanti di FIV vengono correttamente espressi. Quindi, l'impiego dell'anticorpo

monoclonale diretto contro l'epitopo HA ha permesso di visualizzare il livello di ubiquitinazione di Gag. Dai risultati ottenuti, come si può vedere in figura 4, capitolo 12, è possibile confermare che le bande che rappresentano le forme di Gag coniugate ad ubiquitina sono realmente indotte dalla presenza dell'*L domain* e scompaiono in presenza delle mutazioni che influenzano la funzionalità del dominio L (Mut02, ASAA). In conclusione questi dati suggeriscono l'esistenza di una correlazione tra l'ubiquitinazione della proteina Gag di FIV ed il dominio L in essa contenuto.

A partire dalla dimostrazione che il mutante Mut02, che presenta la sequenza del *late domain* PSAP distrutta (ASAA), è completamente incapace di rilasciare VLPs (si veda Figura 1a, Capitolo 12), è stato caratterizzato il contributo dell'intera regione p2 di FIV nella gemmazione e il ruolo di proteine cellulari coinvolte in questo processo.

E' stato osservato che in HIV-1 il difetto nel rilascio di mutanti del dominio tardivo PTAP viene ripristinato dalla sovraespressione della proteina cellulare AIP1/Alix ed, inoltre, che questo fenomeno dipende dall'integrità del sito di legame per AIP1/Alix all'interno della regione p6 di Gag (LYPL) che ricorda il motivo YPDL di EIAV (Usami *et al.*, 2007).

Al fine di valutare se il rilascio del mutante Mut02 (ASAA), potesse essere ripristinato in seguito all'overespressione di AIP1/Alix, cellule 293T sono state cotrasfettate con il costrutto mutante di FIV p Δ env1Mut02 e con p Δ env1 in presenza o meno del plasmide esprime la proteina cellulare AIP1 (pBJ5-AIP1HA).

A distanza di 24 ore dalla trasfezione, i campioni proteici ottenuti, cellulari e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide e successivo Western Blotting. L'utilizzo dell'anticorpo diretto contro la proteina p24 ha permesso di visualizzare tutte le proteine che contengono la suddetta sequenza aminoacidica.

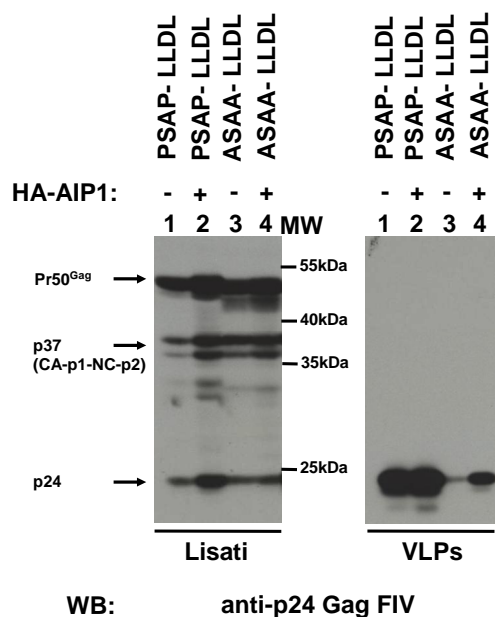


Figura 6.1: Cellule 293T sono state co-trasfettate con pAenv1 (PSAP-LLDL) e pAenv1Mut02 (ASAA-LLDL) come indicato, singolarmente (corsie 1 e 3) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1-HA, corsie 2 e 4). Dopo 24 ore dalla trasfezione i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLPs) sono state analizzate in WesternBlot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come è possibile osservare in Figura 6.1, AIP1/Alix porta ad un ripristino nella capacità di gemmare da parte del costrutto mutante di FIV contenente l'*L domain* completamente distrutto (corsia 4).

A partire da questa evidenza, analizzando in dettaglio la regione p2, è stato possibile identificare un motivo LLDL (aminoacidi 447-450, considerando come aminoacido 1 il primo di Gag), a valle del *late domain* PSAP (tabella 6.1), reminiscente il dominio tardivo YPDL (Puffer *et al.*, 1997), che in EIAV risulta essere essenziale per la gemmazione virale in quanto interagisce con la proteina cellulare AIP1/Alix (Strack *et al.*, 2003).

Per verificare se tale motivo avesse la funzione di dominio tardivo per FIV, sono stati sviluppati dei costrutti mutanti che presentano la regione PSAP (posizioni 438-442) inalterata ed una regione LLDL (posizioni 447-450) parzialmente o completamente distrutta. In particolare, si sono ottenuti mutanti caratterizzati dalla progressiva sostituzione dell'acido aspartico con un'alanina in posizione D449A, (Mut20) e delle leucine con alanine rispettivamente nelle posizioni L447A (Mut20A), L448A (Mut20B) e L450A (Mut21) (Tabella 6.2).

	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	
pΔenv1	P	S	A	P	P	M	E	E	K	L	L	D	L	PSAP-LLDL
pΔenv1Mut20	P	S	A	P	P	M	E	E	K	L	L	D	L	PSAP-LLAL
pΔenv1Mut20A	P	S	A	P	P	M	E	E	K	A	L	A	L	PSAP-ALAL
pΔenv1Mut20B	P	S	A	P	P	M	E	E	K	A	A	A	L	PSAP-AAAL
pΔenv1Mut21	P	S	A	P	P	M	E	E	K	A	A	A	A	PSAP-AAAA

Tabella 6.2: Schema delle mutazioni inserite a livello della regione p2 della poliproteina Gag di FIV. Il dominio tardivo PSAP è evidenziato in blu. Evidenziati in rosso i residui aminoacidici sostituiti. In alto sono indicate le posizioni aminoacidiche, considerando come 1 il primo residuo di Gag di FIV.

Al fine di valutare il rilascio di particelle simil-virali, cellule 293T sono state trasfettate con i mutanti pΔenv1Mut20 (PSAP-LLAL), pΔenv1Mut20A (PSAP-ALAL), pΔenv1Mut20B (PSAP-AAAL), pΔenv1Mut21 (PSAP-AAAA) e con pΔenv1 (PSAP-LLDL). A 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state quindi lisate e le proteine estratte, mentre i surnatanti sono stati purificati su cuscino di saccarosio. I campioni proteici sono stati separati mediante corsa su gel di poliaccrilamide e quindi analizzati con Western Blotting mediante l'impiego dell'anticorpo monoclonale di topo diretto contro la proteina p24.

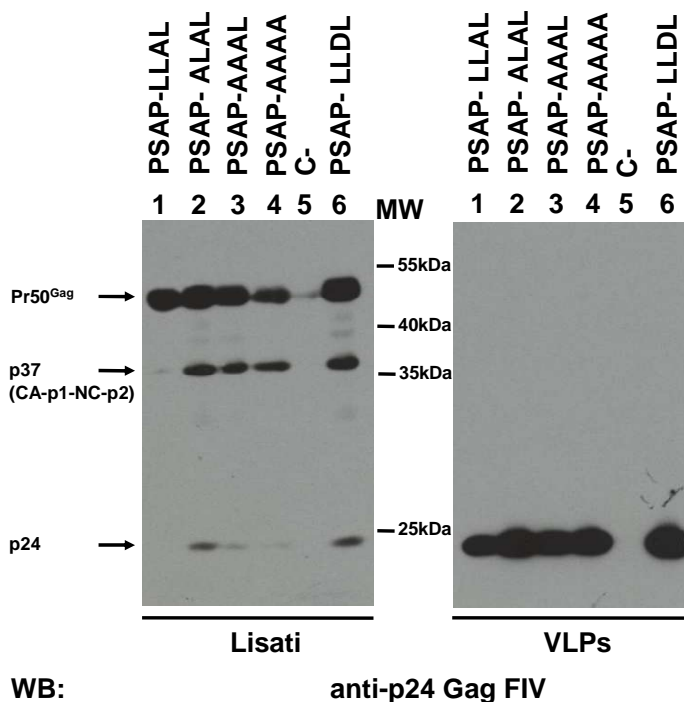


Figura 6.2: Cellule 293T sono state co-trasfettate con pΔenv1Mut20 (PSAP-LLAL, corsia 1), pΔenv1Mut20A (PSAP-ALAL, corsia 2), pΔenv1Mut20B (PSAP-AAAL, corsia 3), pΔenv1Mut21 (PSAP-AAAA, corsia 4) o pΔenv1 (PSAP-LLDL, corsia 6). C-: controllo negativo. Dopo 24 ore dalla trasfezione i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLPs) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV. MW: marker di peso molecolare (PageRulerTM Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come si evince dalla Figura 6.2, è possibile osservare che non vi sono differenze sostanziali nella capacità di rilascio di VLPs a partire da questi costrutti recanti le progressive mutazioni inattivanti a carico del motivo LLDL (Corsie 1, 2, 3 e 4). Attraverso la distruzione del motivo LLDL, abbiamo potuto dimostrare come esso non contribuisca in alcun modo nel rilascio di FIV.

6.2 AIP1/Alix ripristina il rilascio dei mutanti del *late domain* PSAP in modo indipendente dal motivo LLDL

Come anticipato in precedenza, è noto in letteratura che il *late domain* YPDL, presente a livello della proteina p9 di Gag di EIAV, è essenziale per la gemmazione virale in quanto media l'interazione con la proteina cellulare AIP1/ALIX (Puffer *et al.*, 1997; Strack *et al.*, 2003), permettendo così al virus di sfruttare a suo vantaggio il macchinario dei MVB (Calistri *et al.*, 2009b). Nonostante PSAP in HIV-1 sia essenziale per il rilascio delle particelle virali, il motivo YPLTSL, anch'esso mappante in p6 Gag, funziona come *late domain* ausiliario e media, in alcuni casi, il coinvolgimento di AIP1/Alix nel rilascio di HIV-1 (Strack *et al.*, 2003). Inoltre, è stato dimostrato come mutanti di HIV-1 privi del sito di legame per TSG101 in p6 Gag esibiscano un marcato difetto nel rilascio, implicando che il sito di AIP1 non sia sufficiente per un'efficiente gemmazione virale. In contrasto però, il rilascio di questi mutanti può essere ripristinato aumentando il livello di espressione cellulare di AIP1, mantenendo però intatto il sito di legame per ALIX in p6 (Usami *et al.*, 2007).

Dato che il motivo LLDL, identificato nella regione C-terminale del peptide p2 di Gag, non sembra essere importante nella gemmazione virale nel contesto del dominio tardivo *wild type*, è stato indagato se tale motivo potesse funzionare da *late domain* ausiliario nel contesto del Gag di FIV, mimando l'*L-Domain* YPLTSL di HIV-1. Si è quindi voluto analizzare la capacità di AIP1 di ripristinare la gemmazione di mutanti di FIV (Tabella 6.3) caratterizzati del motivo PSAP in ASAA (Mut02, ASAA-LLDL) in combinazione alla completa distruzione del motivo LLDL in AAAA (Mut21-ASAA, ASAA-AAAA) ed un mutante in grado di esprimere la poliproteina Gag di FIV in assenza del dominio p2 (Δ p2, STOP).

Come è possibile osservare in figura 6.3, AIP1/Alix è in grado di ripristinare il rilascio di questi mutanti difettivi per la gemmazione in modo del tutto indipendente dal motivo LLDL. E' possibile affermare inoltre che nessuno degli elementi contenuti in p2 (corsia 8, STOP, VLP) sembra essere responsabile dell'effetto di AIP1. A differenza di quello che accade in HIV-1, sembra quindi che questo motivo in FIV non funzioni da *late domain* accessorio.

A partire da queste osservazioni, sono stati quindi utilizzati costrutti contenenti specifiche mutazioni a livello del motivo tardivo in combinazione con l'inattivazione della proteasi virale (Tabella 6.4).

	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	
pΔenv1	P	S	A	P	P	M	E	E	K	L	L	D	L	PSAP-LLDL
pΔenv1+6	P	S	A	P	P	M	E	E	K	L	L	D	L	+STOP PSAP-LLDL+STOP
pΔenv1MUT02+6	A	S	A	A	P	M	E	E	K	L	L	D	L	+STOP ASAA-LLDL+STOP
pΔenv1Mut21+6	A	S	A	A	P	M	E	E	K	A	A	A	A	+STOP PSAP-AAAA+STOP
pΔenv1MutΔp2+6	STOP	S	A	P	P	M	E	E	K	L	L	D	L	+STOP STOP+STOP

Tabella 6.4: Schema delle mutazioni a livello della regione p2 della poliproteina Gag di FIV. Il dominio tardivo PSAP è evidenziato in blu. Evidenziati in rosso i residui aminoacidici sostituiti. In alto sono indicate le posizioni aminoacidiche, considerando come 1 il primo residuo di Gag di FIV. Tali costrutti inoltre presentano un codone di stop al posto dell'aminoacido 10 della proteasi.

Per questi studi di incorporazione, cellule 293T sono co-trasfettate con i plasmidi pΔenv1Mut6 (PSAP-LLDL+STOP), pΔenv1Mut02+6 (ASAA-LLDL+STOP), pΔenv1Mut21+6 (PSAP-AAAA+STOP), o pΔenv1Δp2+6 (STOP+STOP) in presenza o meno del costrutto esprimente AIP1/Alix (pBJ5-AIP1-HA). Inoltre, è stato anche verificato che AIP1/Alix non venisse rilasciata in modo costitutivo nel sovrantante delle colture cellulari trasfettate. Per questo, cellule 293T sono state trasfettate esclusivamente con il costrutto esprimente la proteina AIP1/Alix (pBJ5-AIP1-HA). Dopo 36 ore, i campioni proteici ottenuti, lisati cellulari e sovrantanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting con anticorpo diretto contro la proteina p24 Gag di FIV. In parallelo è stata valutata l'espressione nelle VLPs delle proteina AIP1/ALIX mediante Western Blotting con un anticorpo diretto contro l'epitopo HA.

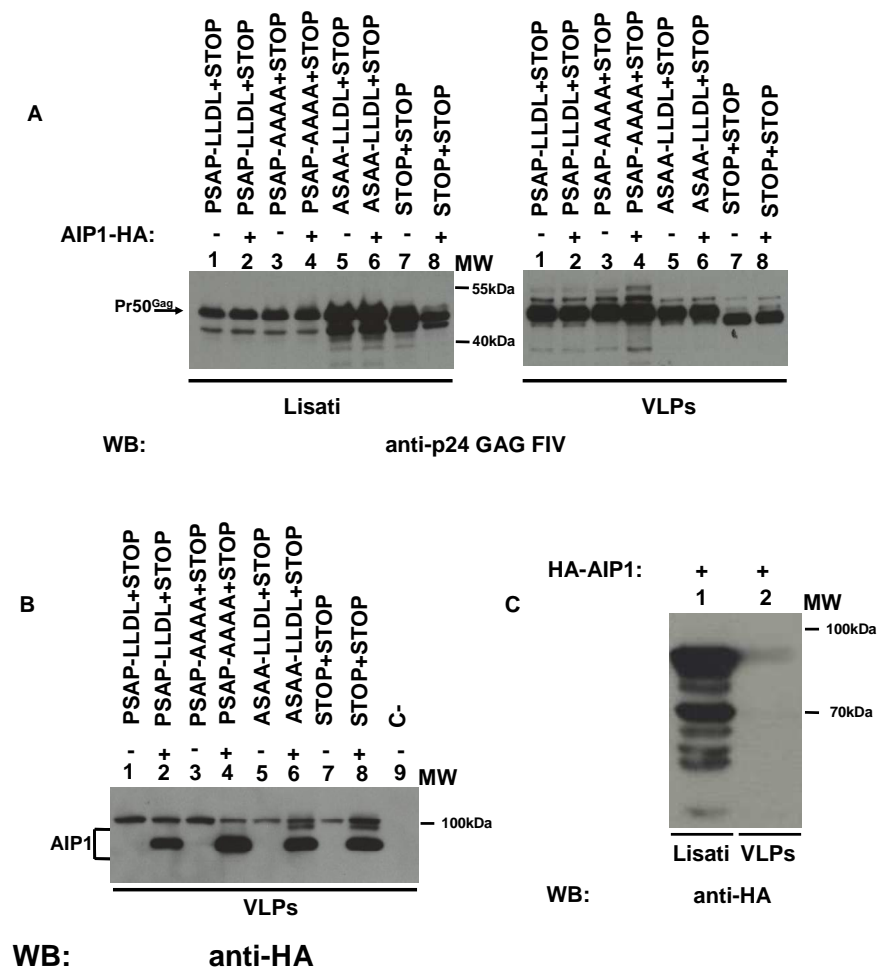


Figura 6.5: Cellule 293T sono state co-trasfettate con pΔenv1Mut6 (PSAP-LLDL+STOP), pΔenv1Mut21+6 (PSAP-AAAA+STOP), pΔenv1Mut02+6 (ASAA-LLDL+STOP), pΔenv1Δp2 (STOP+STOP) come indicato, singolarmente (corsie 1, 3, e 5) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1-HA, corsie 2, 4 e 6). C-: controllo negativo. Dopo 36 ore dalla trasfezione i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLPs) sono state analizzate in Western Blot utilizzando: **A)** un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV e **B)** un anticorpo monoclonale diretto contro il tag HA. **C)** Western Blotting dei lisati cellulari e dei sovranatanti derivati da cellule 293T trasfettate con il plasmide pBJ5-AIP1HA: lisati cellulari (corsia 1) e sovranatanti (corsia 2). MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Dalla figura 6.5 è possibile notare come nessun motivo presente in p2 Gag di FIV sia strettamente necessario per l'incorporazione di AIP1/Alix nelle VLPs di FIV. Infatti, né il motivo PSAP (corsia 6, ASAA-LLDL, pannello B, VLP) né il motivo LLDL (corsia 4, PSAP-AAAA, pannello B, VLP) e nemmeno l'intero p2 (corsia 8, STOP+STOP, pannello B, VLP) è responsabile di tale fenomeno. E' stato possibile anche dimostrare come AIP1/Alix non venga rilasciata costitutivamente nel surnatante delle cellule trasfettate con il plasmide codificante tale proteina (pannello C).

6.3 Mutagenesi della regione nucleocapside di Gag di FIV

Recenti lavori pubblicati hanno dimostrato che, in aggiunta al motivo YPLTSL, anche il dominio NC di Gag di HIV-1 svolge un ruolo nella gemmazione virale, in virtù dell'interazione con la proteina AIP1/Alix (Popov *et al.*, 2008). In particolare, Popov e collaboratori hanno identificato i due motivi *zinc-fingers* del NC quali interattori del dominio Bro1 di AIP1/Alix, evidenziando come l'inattivazione combinata dell'ultima cisteina degli stessi (C28 e C49) sia sufficiente per ridurre significativamente l'interazione del NC con AIP1/Alix (Popov *et al.*, 2008). Studi successivi hanno confermato ed esteso questi risultati, dimostrando che anche i residui basici localizzati a livello della metà aminoterminale della regione del NC di Gag partecipano all'interazione con Bro1 (Dussupt *et al.*, 2009).

In seguito a comparazione bioinformatica tra il NC di FIV e quello di HIV-1 (Figura 6.4B), è stato possibile verificare che tra le due regioni vi è un alto tasso di omologia, in particolare proprio a livello dei motivi *zinc finger*.

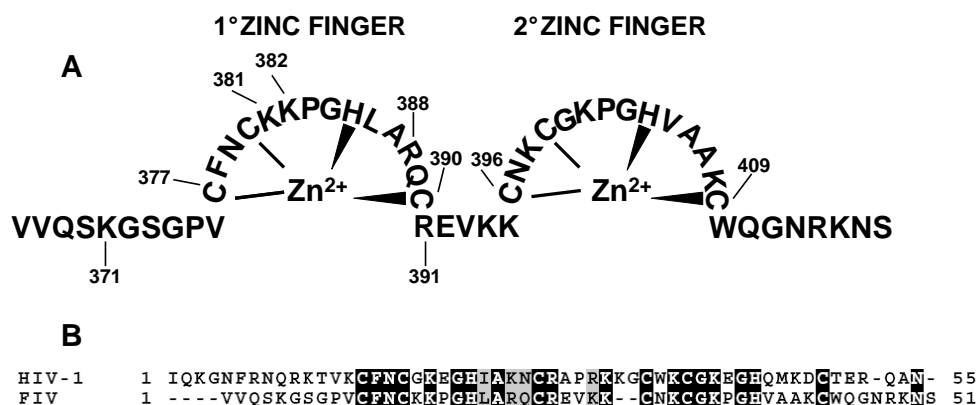


Figura 6.4: **A)** Rappresentazione schematica del nucleocapside di FIV (51 residui, posizioni aminoacidiche 367-417, a partire dal primo residuo della matrice di Gag); **B)** comparazione bioinformatica della sequenza aminoacidica del NC di Gag di HIV-1 con quella di FIV. Metodo ClustalW2 e BOXSHADE. Gli aminoacidi in nero sono identici; i residui conservati o simili sono in grigio; gli aminoacidi non correlati sono in bianco.

A partire da queste evidenze, sono stati quindi ottenuti una serie di costrutti basati sul plasmide pΔenv1 recanti specifiche sostituzioni aminoacidiche a livello del NC di Gag in combinazione, o meno, a mutazioni della regione p2 contenente il *late domain*. In particolare, i codoni conservati dei residui di cisteina (C377, C390, C396 e C409) nel NC sono stati mutati in serina (S) ed i residui basici, arginine (R388 e R391) e lisine (K371, K381 e K381), della porzione aminoterminale sono stati sostituiti rispettivamente con alanine (A) ed arginine (R). Tali mutazioni a livello del nucleocapside sono state eseguite a livello i) del dominio tardivo *wild type*, PSAP (pΔenv1) o completamente inattivato, ASAA (pΔenv1Mut02); ii) in combinazione alla completa distruzione del motivo LLDL in AAAA (pΔenv1Mut21) ed, infine,

iii) anche nel contesto del mutante in grado di esprimere la sola poliproteina Gag di FIV in assenza del dominio p2 (p Δ env1 Δ p2) (Figura 6.6).

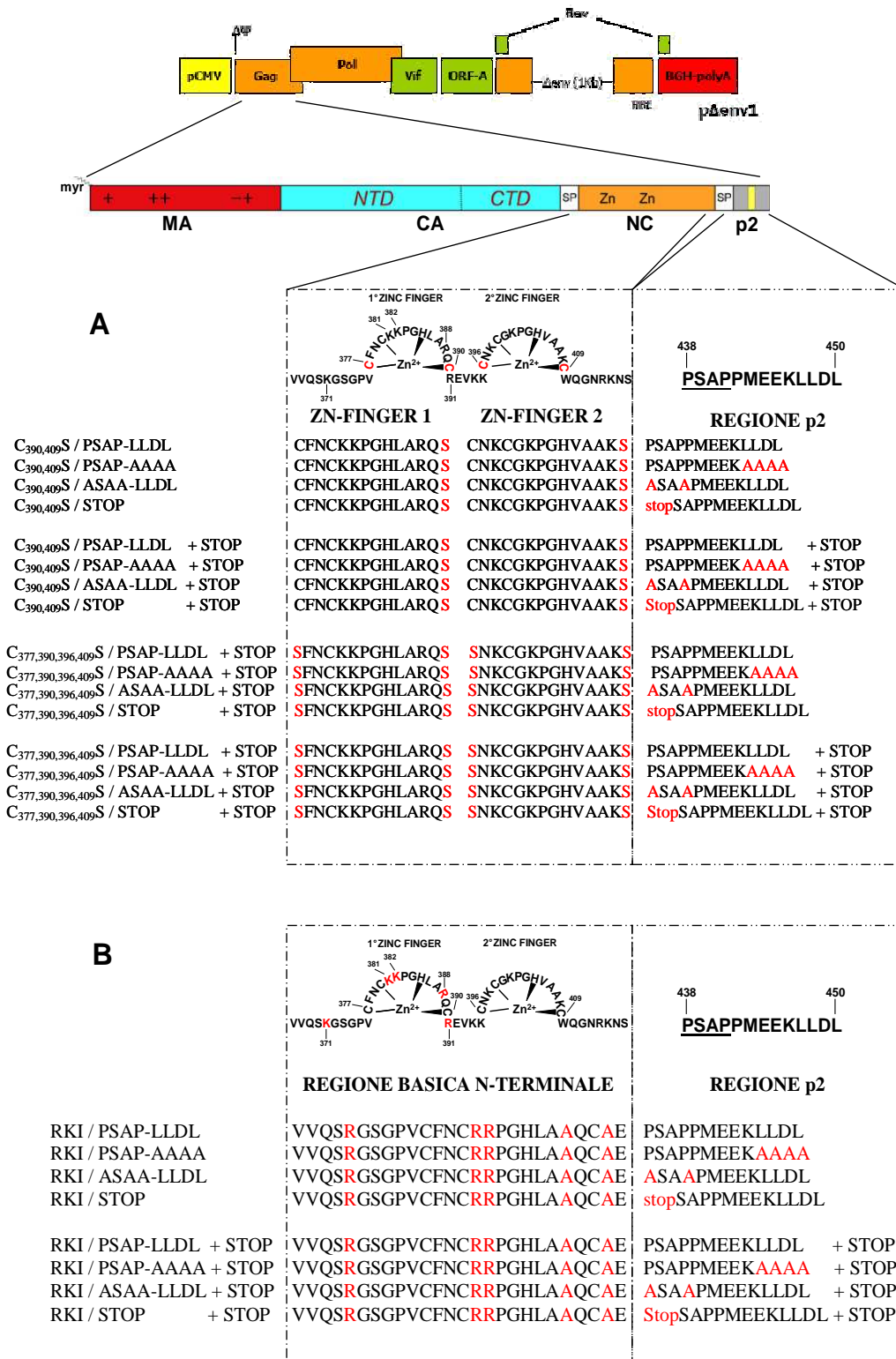


Figura 6.6: Costrutti FIV-derivati recanti le mutazioni a livello degli A) zinc fingers o B) dei residui basici della regione aminoterminale del nucleocapside.

6.4 Ruolo delle cisteine in posizione 377, 390, 396 e 409 degli *zinc-fingers* del nucleocapside e dei domini tardivi mutati di Gag sul rilascio delle particelle simil-virali

Alla luce dei risultati fino ad ora ottenuti e di quanto riportato in letteratura relativamente ad HIV-1 (Popov *et al.*, 2008), è stato valutato se la capacità di AIP1/Alix di revertire i difetti di gemmazione dei mutanti difettivi a livello del *late domain* fosse dipendente dalla regione del nucleocapside e, in special modo, dai residui chiave di cisteina.

A tale scopo, sono stati generati diversi costrutti FIV-basati recanti le sostituzioni C390S e C409S a livello degli *zinc-finger* del nucleocapside in presenza o meno di mutazioni a livello del p2 di Gag (Figura 6.6A).

Allo scopo di verificare se la sovraespressione di AIP1/Alix fosse in grado di aumentare il rilascio di questi mutanti, cellule 293T sono state cotrasfettate con i costrutti pΔenv1 (PSAP-LLDL), pΔenv1/390, 409 (C_{390,409}S/PSAP-LLDL), pΔenv1Mut21 (PSAP-AAAA), pΔenv1/390, 409/Mut21 (C_{390,409}S /PSAP-AAAA), pΔenv1Mut02 (ASAA-LLDL), pΔenv1/390, 409/Mut02 (C_{390,409}S/ASAA-LLDL), pΔenv1MutΔp2 (STOP) o pΔenv1/390, 409/MutΔp2 (C_{390,409}S /STOP), in presenza o meno del plasmide esprimente la proteina AIP1/Alix (pBJ5-AIP1-HA). Dopo 24 ore, i campioni proteici ottenuti, lisati cellulari e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting utilizzando un anticorpo specifico contro diretto la proteina p24 Gag.

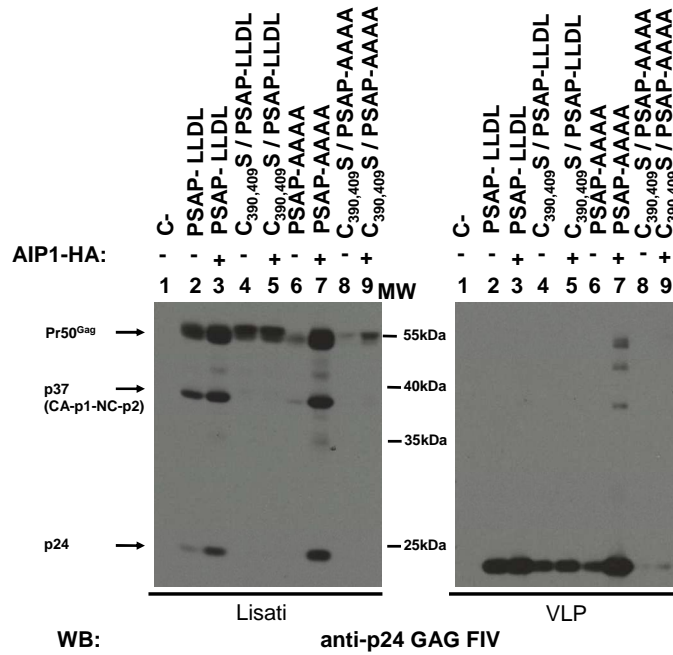


Figura 6.7: Cellule 293T sono state co-trasfettate con pΔenv1 (PSAP-LLDL); pΔenv1/390, 409 (C_{390,409}S/PSAP-LLDL), pΔenv1Mut21 (PSAP-AAAA), pΔenv1Mut21/390, 409 (C_{390,409}S/PSAP-AAAA), singolarmente (corsie 2, 4, 6, 8) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1-HA, corsie 3, 5, 7, 9). C-: controllo negativo costituito dal costrutto pBluescript@II KS. Dopo 24 ore dalla trasfezione i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

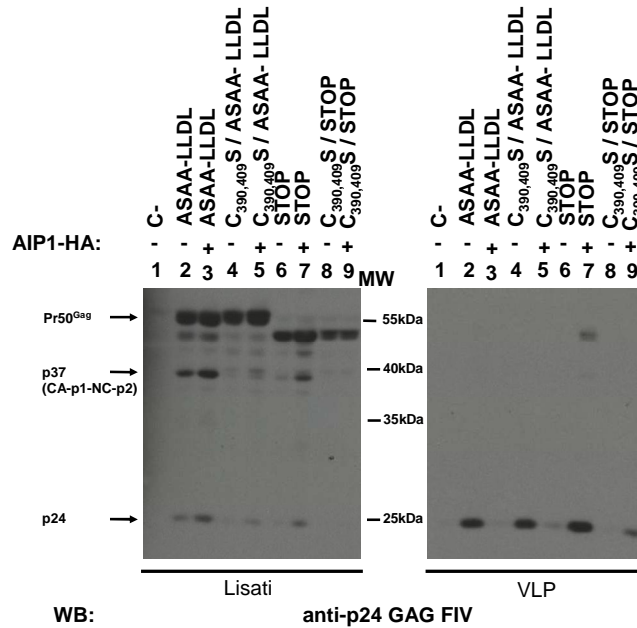


Figura 6.8: Cellule 293T sono state co-trasfettate con pΔenv1Mut02 (ASAA-LLDL), pΔenv1Mut02/390, 409 (C_{390,409}S/ASAA-LLDL), pΔenv1Δp2 (STOP), pΔenv1Δp2/ 390, 409 (C_{390,409}S/STOP), singolarmente (lane 2, 4, 6, 8) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1- HA, corsie 3, 5, 7, 9). C-: controllo negativo costituito dal costrutto pBluescript@II KS. Dopo 24 ore dalla trasfezione i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Dalle figure 6.7 e 6.8, è possibile evidenziare come, nel complesso, vi sia una riduzione della gemmazione dei mutanti a livello della sequenza del nucleocapside (corsie 4 e 8) rispetto ai corrispondenti costrutti caratterizzati dalla sequenza *wild-type* (corsie 2 e 6).

Inoltre, come si osserva dalla figura 6.7, i costrutti recanti la sequenza *wild-type* del dominio tardivo di FIV gemmano in VLPs mature indipendentemente dall'espressione della proteina AIP1/Alix ($C_{390,409}S/PSAP-LLDL$, $C_{390,409}S/PSAP-AAAA$, corsie 4, 5, 8 e 9). La figura 6.8 evidenzia invece come la sovraespressione della proteina AIP1/Alix induca, come dimostrato in precedenza (Figura 6.1), il ripristino della capacità di gemmare dei mutanti caratterizzati dall'inattivazione del dominio tardivo o dalla delezione della regione p2 di Gag ($ASAA-LLDL$, $STOP$, corsie 3 e 7). Analogamente, l'impiego dei costrutti che, in aggiunta a tali mutazioni, recano la doppia sostituzione dei residui di cisteina nelle posizioni 390 e 409 del nucleocapside, induce un apprezzabile aumento del rilascio in presenza di sovraespressione di AIP1/Alix ($C_{390,409}S/ASAA-LLDL$, $C_{390,409}S/STOP$, corsie 5 e 9).

Si è quindi proceduto ad indagare se la proteina AIP1/Alix venisse incorporata nelle particelle simil-virali prodotte a partire dai medesimi costrutti privi dell'attività proteasica, a causa dell'introduzione di un codone di stop in posizione 10 della proteasi virale (Figura 6.6A).

A tale scopo, cellule 293T sono state trasfettate con i mutanti $p\Delta env1/390, 409/Mut6$ ($C_{390,409}S/PSAP-LLDL+STOP$), $p\Delta env1/390, 409/Mut21+6$ ($C_{390,409}S/PSAP-AAAA+STOP$), $p\Delta env1/390, 409/Mut02+6$ ($C_{390,409}S/ASAA-LLDL+STOP$) o $p\Delta env1/390, 409/Mut\Delta p2+6$ ($C_{390,409}S/STOP+STOP$), in presenza o meno del plasmide codificante AIP1/Alix. Dopo circa 36 ore dalla trasfezione, le cellule sono state lisate e le proteine estratte, mentre i surnatanti sono stati purificati su cuscino di saccarosio e, in seguito, lisati. I campioni proteici ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e a successivo Western Blotting utilizzando l'anticorpo monoclonale diretto contro la proteina p24, per valutare l'espressione ed il processamento della poliproteina Gag, e l'anticorpo diretto contro l'epitopo HA, per analizzare l'incorporazione della proteina AIP1-HA nelle VLPs.

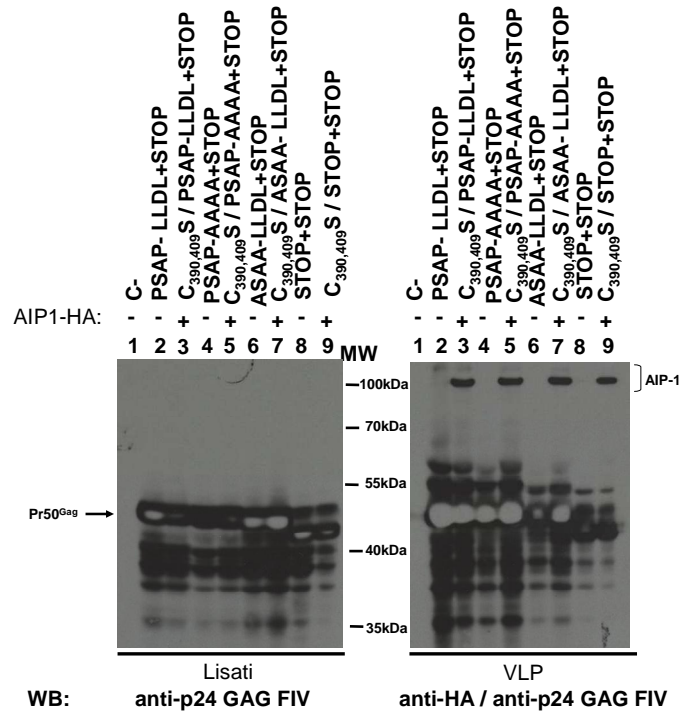


Figura 6.9: Cellule 293T sono state co-trasfettate con pΔenv1Mut6 (PSAP-LLDL+STOP), pΔenv1Mut6/390, 409 (C_{390,409}S/PSAP-LLDL+STOP), pΔenv1Mut21+6 (PSAP-AAAA+STOP), pΔenv1Mut21+6/390, 409 (C_{390,409}S/PSAP-AAAA+STOP), pΔenv1Mut02+6 (ASAA-LLDL+STOP), pΔenv1Mut02+6/390, 409 (C_{390,409}S/ASAA-LLDL+STOP), pΔenv1Δp2+6 (STOP+STOP), pΔenv1Δp2+6/390, 409 (C_{390,409}S/STOP+STOP), singolarmente (corsie 2, 4, 6, 8) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1-HA, corsie 3, 5, 7, 9). C-: controllo negativo costituito dal costrutto pBluescript®II KS. Dopo 24 ore dalla trasfezione i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV in combinazione o meno con un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo HA. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come dimostra la figura 6.9, si verifica un'efficiente incorporazione della proteina cellulare AIP1/Alix nelle particelle simil-virali prodotte a partire da tutti i costrutti di FIV analizzati.

A differenza di quanto accade in HIV-1, nel complesso questi risultati non consentono di inferire un ruolo per le posizioni aminoacidiche 390 e 409 del nucleocapside di FIV nel mediare il coinvolgimento della proteina AIP1/Alix nella gemmazione virale.

Alla luce dei risultati ottenuti, si è voluto quindi investigare il contributo al rilascio di particelle simil-virali delle cisteine in posizione 377 e 396 dello stesso dominio di Gag, in associazione ai residui precedenti.

Sono stati generati ulteriori costrutti FIV-basati recanti le sostituzioni C377S, C390S, C396S e C409S a livello degli *zinc-finger* del nucleocapside in presenza o meno di mutazioni a livello del p2 di Gag (Figura 6.6A).

Per analizzare se la sovraespressione di AIP1/Alix fosse in grado di aumentare il rilascio di questi mutanti, cellule 293T sono state trasfettate con i costrutti pΔenv1 (PSAP-LLDL), pΔenv1/377, 390, 396, 409 (C_{377,390,396,409}S/PSAP-LLDL),

pΔenv1Mut21 (PSAP-AAAA), pΔenv1//377, 390, 396, 409/Mut21 (C_{377,390,396,409}S/PSAP-AAAA), pΔenv1Mut02 (ASAA-LLDL), pΔenv1/377, 390, 396, 409/Mut02 (C_{377,390,396,409}S/ASAA-LLDL), pΔenv1MutΔp2 (STOP) o pΔenv1/377, 390, 396, 409/MutΔp2 (C_{377,390,396,409}S/STOP), in presenza o meno del plasmide esprime la proteina cellulare AIP1/Alix. A distanza di 24 ore dalla trasfezione, i campioni proteici ottenuti, lisati cellulari e sovranatanti, sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting con l'impiego di un anticorpo diretto contro la proteina p24.

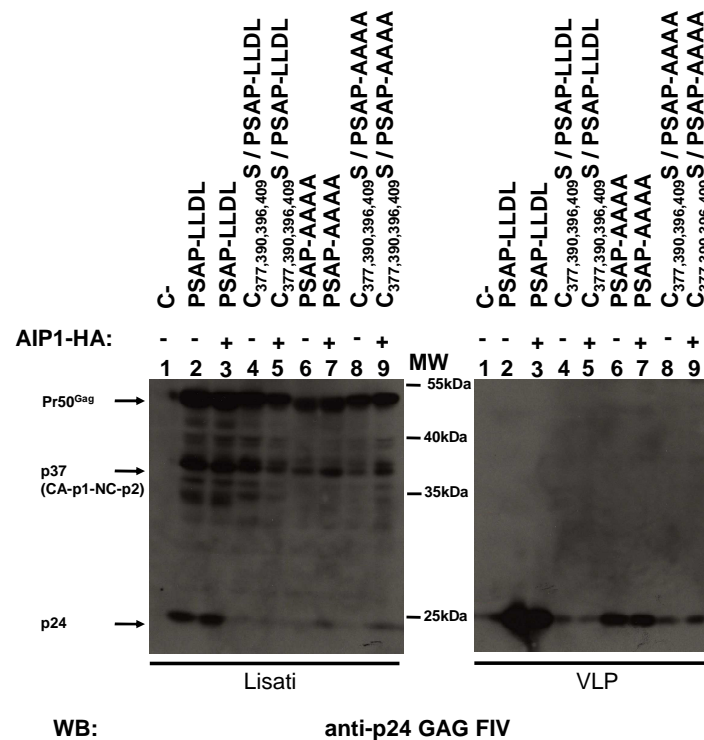


Figura 6.10: Cellule 293T sono state co-trasfettate con pΔenv1 (PSAP-LLDL), pΔenv1/377, 390, 396, 409 (C_{377,390,396,409}S /PSAP-LLDL), pΔenv1Mut21 (PSAP-AAAA), pΔenv1Mut21/377, 390, 396, 409 (C_{377,390,396,409}S /PSAP-AAAA), singolarmente (corsie 2, 4, 6, 8) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1-HA, corsie 3, 5, 7, 9). C-: controllo negativo costituito dal costrutto pBluescript®II KS. Dopo 24 ore dalla trasfezione i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

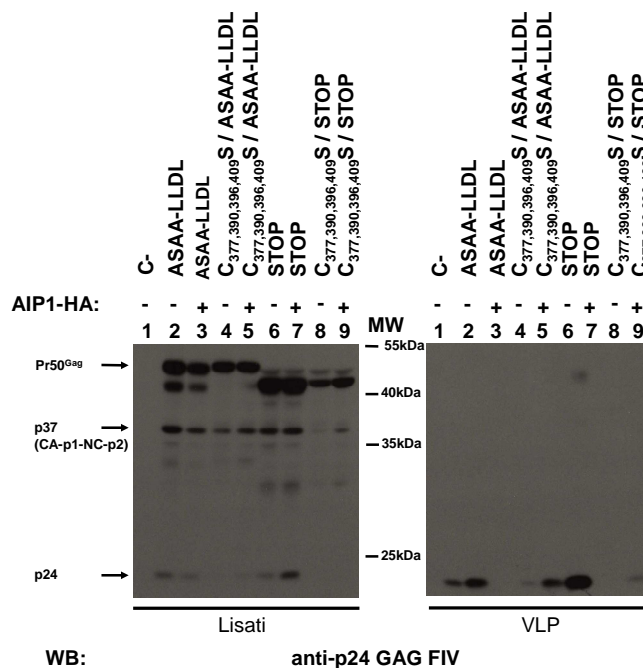


Figura 6.11: Cellule 293T sono state co-trasfettate con p Δ env1Mut02 (ASAA-LLDL), p Δ env1Mut02/377, 390, 396, 409 (C_{377,390,396,409}S /ASAA-LLDL), p Δ env1 Δ p2 (STOP), p Δ env1 Δ p2/ 377, 390, 396, 409 (C_{377,390,396,409}S /STOP), singolarmente (corsie 2, 4, 6, 8) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1-HA, corsie 3, 5, 7, 9). C-: controllo negativo costituito dal costrutto pBluescript®II KS. Dopo 24 ore dalla trasfezione i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Dalle figure 6.10 e 6.11, è possibile evidenziare come, nel complesso, vi sia una riduzione della gemmazione dei mutanti a livello della sequenza del nucleocapside (corsie 4 e 8) rispetto ai corrispondenti costrutti caratterizzati dalla sequenza *wild-type* (corsie 2 e 6).

In modo analogo alla mutazione dei residui mutati nelle posizioni 390 e 409, anche in questo caso si evince come la sovraespressione della proteina AIP1/Alix non sia in grado di determinare un aumento significativo del rilascio di VLPs prodotte a partire dai costrutti mutati nelle posizioni 377, 390, 396 e 409 del nucleocapside (Figura 6.10, C_{377,390,396,409}S/PSAP-LLDL e C_{377,390,396,409}S/PSAP-AAAA, corsie 4, 5, 8 e 9; Figura 6.11, C_{377,390,396,409}S/ASAA-LLDL e C_{377,390,396,409}S/STOP, corsie 4, 5, 8 e 9).

Si è quindi proceduto ad indagare se la proteina AIP1/Alix venisse incorporata nelle VLPs prodotte a partire dai medesimi costrutti privi dell'attività proteasica (Figura 6.6A).

A questo scopo, cellule 293T sono state trasfettate con i costrutti p Δ env1/377, 390, 396, 409/Mut6 (C_{377,390,396,409}S/PSAP-LLDL+STOP), p Δ env1/377, 390, 396, 409/Mut21+6 (C_{377,390,396,409}S/PSAP-AAAA+STOP), p Δ env1/377, 390, 396, 409/Mut02+6 (C_{377,390,396,409}S/ASAA-LLDL+STOP) o p Δ env1/377, 390, 396,

409/Mut Δ p2+6 (C_{377,390,396,409}S/STOP+STOP), in presenza o meno del plasmide pBJ5-AIP1HA.

Dopo 36 ore dalla trasfezione, i campioni proteici ottenuti, lisati cellulari e sovranatanti, sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di poliaccrilamide e visualizzati tramite Western Blotting attraverso l'impiego dell'anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag, per valutare l'espressione ed il processamento della poliproteina Gag, e l'anticorpo diretto contro l'epitopo HA, per valutare l'incorporazione della proteina AIP1-HA nelle VLPs.

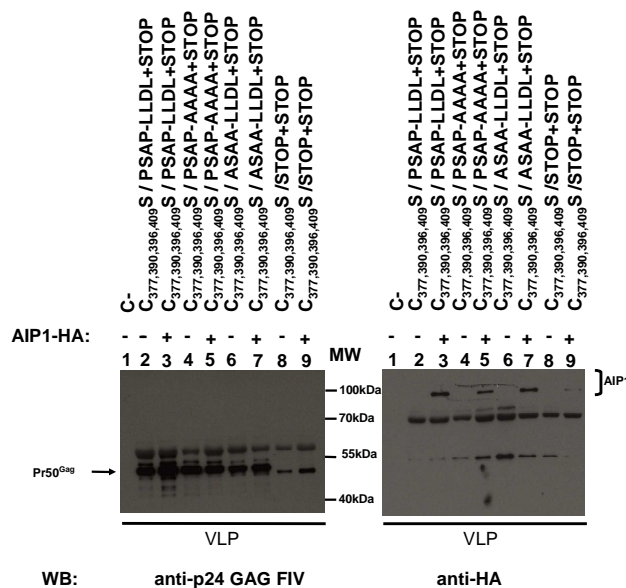


Figura 6.12: Cellule 293T sono state co-trasfettate con p Δ env1Mut6 (PSAP-LLDL+STOP), p Δ env1Mut6/377, 390, 396, 409 (C_{377,390,396,409}S /PSAP-LLDL+STOP), p Δ env1Mut21+6 (PSAP-AAAA+STOP), p Δ env1Mut21+6/377, 390, 396, 409 (C_{377,390,396,409}S/PSAP-AAAA+STOP) p Δ env1Mut02+6 (ASAA-LLDL+STOP), p Δ env1Mut02+6/377, 390, 396, 409 (C_{377,390,396,409}S/ASAALLDL+STOP), p Δ env1 Δ p2+6 (STOP+STOP), p Δ env1 Δ p2+6/ 377, 390, 396, 409 (C_{377,390,396,409}S /STOP+STOP), singolarmente (corsie 2, 4, 6, 8) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1-HA, corsie 3, 5, 7, 9). C-: controllo negativo costituito dal costrutto pBluescript®II KS. Dopo 24 ore dalla trasfezione le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV (pannello di sinistra) e un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo HA (pannello di destra). MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Dall'analisi della figura 6.12, si riscontra l'incorporazione della proteina AIP1/Alix nelle particelle simil-virali prodotte a partire da tutti i costrutti di FIV esaminati (C_{377,390,396,409}S/PSAP-LLDL+STOP, C_{377,390,396,409}S/PSAP-AAAA+STOP, C_{377,390,396,409}S/ASAA-LLDL+STOP, C_{377,390,396,409}S/STOP+STOP, corsie 3, 5, 7 e 9).

Nel complesso, le evidenze sperimentali ottenute indicano l'assenza di coinvolgimento dei residui di cisteina in posizione 377, 390, 396 e 409 dei motivi *zinc-fingers* del NC di FIV nel ripristino della gemmazione di mutanti del *late*

domain, in presenza di sovraespressione di AIP1/Alix, e nell'incorporazione della stessa proteina cellulare nelle particelle virali.

6.5 Ruolo dei residui basici aminoterminali del nucleocapside e dei mutanti del *late domain* di Gag sul rilascio di particelle simil-virali

Mutazioni a livello degli aminoacidi basici della regione aminoterminali di NC, causano la mancata reversione dei difetti di gemmazione di mutanti del dominio tardivo di HIV-1, in presenza di sovraespressione di AIP1/Alix, e determinano la riduzione del rilascio di virioni che presentano il *late domain* intatto (Dussupt *et al.*, 2009).

A partire da queste osservazioni, sono stati ottenuti costrutti FIV (Figura 6.4B) recanti la sostituzione delle lisine con arginine, e delle arginine con alanine, nella regione del nucleocapside che si estende tra le posizioni aminoacidiche 367 e 392, comprensiva del primo *zinc-finger* (K_{371,381,382}R, R_{388,391}A), in combinazione con le mutazioni al dominio tardivo della regione p2 di Gag. A partire dai medesimi costrutti inoltre, sono stati generati le relative controparti prive dell'attività proteasica (Figura 6.6B).

Sono stati quindi valutati il rilascio di VLPs e la capacità di AIP1/Alix, qualora overespressa, di revertire i difetti di gemmazione di questi mutanti. A tale scopo, cellule 293T sono state cotrasfettate con i costrutti mutanti pΔenv1 (PSAP-LLDL), pΔenv1/RKI (PSAP-LLDL/RKI), pΔenv1Mut21 (PSAP-AAAA), pΔenv1/Mut21/RKI (PSAP-AAAA/RKI), pΔenv1Mut02 (ASAA-LLDL), pΔenv1/RKI (ASAA-LLDL/RKI), pΔenv1MutΔp2 (STOP) o pΔenv1MutΔp2/RKI (STOP/RKI), in presenza o meno del plasmide esprimente la proteina cellulare AIP1/Alix. A distanza di 24 ore dalla trasfezione, i campioni proteici ottenuti, lisati cellulari e sovranatanti, sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting con l'impiego di un anticorpo diretto contro la proteina p24.

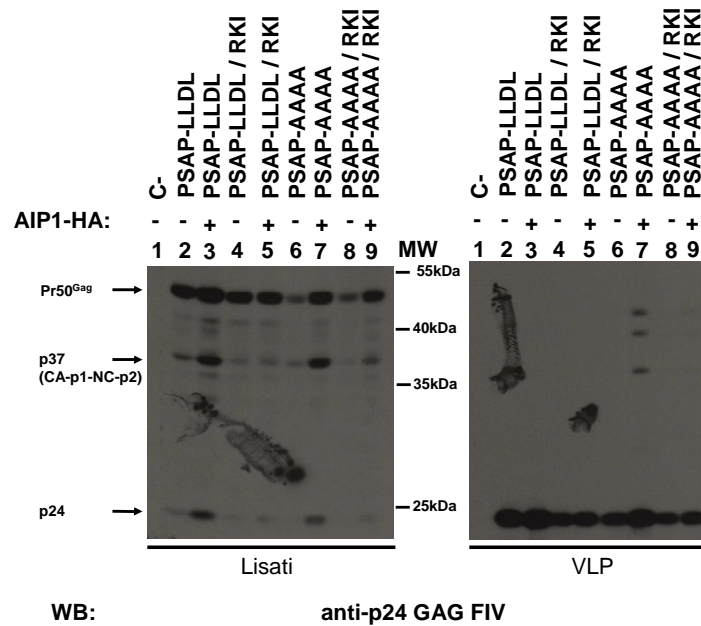


Figura 6.13: Cellule 293T sono state co-trasfettate con pΔenv1 (PSAP-LLDL), pΔenv1/ RKI (PSAP-LLDL/ RKI), pΔenv1Mut21 (PSAPAAAA), pΔenv1Mut21/ RKI (PSAP-AAAA/ RKI), singolarmente (corsie 2, 4, 6, 8) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1-HA, corsie 3, 5, 7, 9). C-: controllo negativo costituito dal costrutto pBluescript®II KS. Dopo 24 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

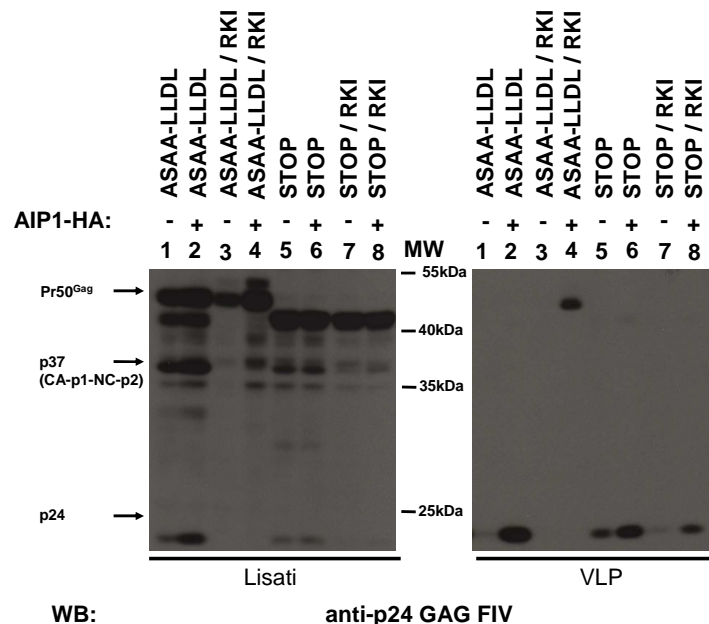


Figura 6.14: Cellule 293T sono state co-trasfettate con pΔenv1Mut02 (ASAA-LLDL), pΔenv1Mut02/ RKI (ASAA-LLDL/ RKI), pΔenv1Δp2 (STOP), pΔenv1Δp2 (STOP/ RKI), singolarmente (corsie 2, 4, 6, 8) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1-HA, corsie 3, 5, 7, 9). Dopo 24 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Dalle figure 6.13 e 6.14, è possibile evidenziare come, nel complesso, vi sia una riduzione della gemmazione dei mutanti a livello della sequenza del nucleocapside (corsie 4 e 8) rispetto ai corrispondenti costrutti caratterizzati dalla sequenza *wild-type* (corsie 2 e 6). I risultati indicano inoltre come AIP1/Alix, qualora overespressa, sia in grado di incrementare il rilascio di particelle simil-virali prodotte da parte di costrutti mutati nella regione aminoterminale del nucleocapside (Figura 6.13, PSAP-LLDL/RKI e PSAP-AAAA/RKI, corsie 4, 5, 8 e 9), in particolare da quelli con il *late domain* PSAP distrutto o privi del dominio p2 (Figura 6.14, ASAA-LLDL/RKI e STOP/RKI, corsie 4, 5, 8 e 9).

Allo scopo di indagare se la proteina AIP1/Alix venisse incorporata nelle particelle simil-virali prodotte da tali mutanti, cellule 293T sono state trasfettate con i costrutti p Δ env1Mut6/RKI (PSAP-LLDL+STOP/RKI), p Δ env1Mut21+6/RKI (PSAP-AAAA+STOP/RKI), p Δ env1Mut02+6/RKI (ASAA-LLDL+STOP/RKI) o p Δ env1Mut Δ p2+6/RKI (STOP+STOP/RKI), in presenza o meno del plasmide esprimente AIP1/Alix. Dopo 36 ore dalla trasfezione, i campioni proteici ottenuti, lisati cellulari e sovranatanti, sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e visualizzati tramite Western Blotting attraverso l'impiego dell'anticorpo monoclonale anti-p24, per valutare l'espressione ed il processamento della poliproteina Gag, e l'anticorpo diretto contro l'epitopo HA, per valutare l'incorporazione della proteina AIP1-HA nelle VLPs.

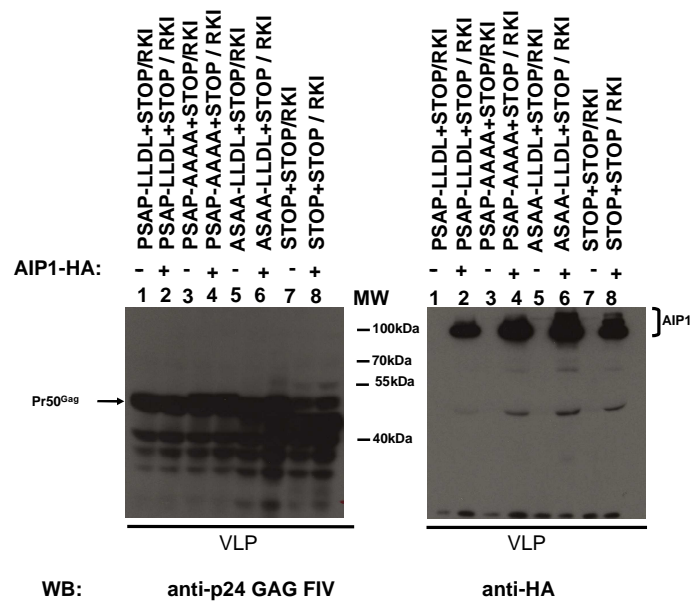


Figura 6.15: Cellule 293T sono state co-trasfettate con p Δ env1Mut6/ RKI (PSAP-LLDL+STOP/RKI), p Δ env1Mut21+6/ RKI (PSAP-AAAA+STOP/ RKI), p Δ env1Mut02+6 (ASAA-LLDL+STOP/ RKI) e p Δ env1 Δ p2+6 (STOP+STOP/ RKI), singolarmente (corsia 2, 4, 6, 8) o in combinazione con pBJ5-HA AIP1 (AIP1-HA, corsia 3, 5, 7, 9). Dopo 24 ore dalla trasfezione, le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV (pannello di sinistra) e di un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo HA (pannello di destra). MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come è possibile evincere dall'immagine 6.13, tutti i mutanti a livello della regione aminoterminale incorporano AIP1/Alix nelle VLPs (Figura 6.15, PSAP-LLDL+STOP/RKI, PSAP-AAAA+STOP/RKI, ASAA-LLDL+STOP/RKI o STOP+STOP/RKI, corsie 2,4, 6 e 8).

Nel complesso, le evidenze sperimentali fino ad ora ottenute indicano che i residui basici del nucleocapside di FIV non partecipano nel ripristino della gemmazione di mutanti del *late domain* ad opera di AIP1/Alix e nemmeno nella sua incorporazione nelle VLPs.

7. RISULTATI

FATTORI CELLULARI DELL'OSPITE IN GRADO DI INTERFERIRE NELLA GEMMAZIONE DI FIV: TETERINA

Premessa

E' noto in letteratura come alcune proteine cellulari dell'ospite interferiscano con il ciclo replicativo dei virus a RNA a diversi livelli: nell'*uncoating*, nella retrotrascrizione inversa e nel rilascio virale (Strebel *et al.*, 2009). In particolare, per quanto riguarda la fase di gemmazione, è stato recentemente riportato che la proteina BST2, rinominata teterina, rappresenta il fattore cellulare dell'immunità innata in grado di bloccare il rilascio di vari virus dotati di *envelope*. I virus hanno a loro volta evoluto proteine virali atte ad antagonizzarne la funzione (Neil *et al.*, 2008, Evans *et al.*, 2010).

In tale contesto, lo scopo della ricerca è stato quello di valutare l'esistenza di una teterina, espressa nelle cellule feline, ortologa a quella umana, capace di interferire con la gemmazione di FIV. A tale proposito, abbiamo eseguito un'accurata analisi bioinformatica nel genoma del gatto al fine di identificare tale proteina. Essa è stata quindi clonata a partire da cellule fibroblastoidi della porzione corticale del rene di gatto (CrFK), che rappresentano le cellule di elezione per la produzione di questo virus. Si è quindi proceduto ad esaminare la sua attività contro FIV, iniziando così ad analizzare l'eventuale presenza di una proteina accessoria e/o strutturale in FIV in grado di antagonizzarne l'effetto. Inoltre, per valutare la specie-specificità è stata analizzata la sua capacità di interferire con il rilascio virale di HIV-1. Come controllo è stata clonata la forma umana di teterina a partire da cellule epiteliali umane di cancro alla cervice (HeLa) che esprimono costitutivamente tale proteina (Neil *et al.*, 2008). Tutti gli esperimenti di caratterizzazione di BST2 sono stati eseguiti in cellule embrionali di rene umano (293T) in quanto non presentano livelli endogeni significativi della forma umana di teterina (Neil *et al.*, 2008).

7.1 Identificazione e clonaggio del prodotto del gene *bst2* del genoma felino

Le cellule di mammifero possiedono un'attività antivirale, costitutiva o indotta dall'interferone α , capace di inibire il rilascio delle particelle virali di vari virus dotati di *envelope*. In tale contesto, nelle cellule umane è stato dimostrato che la

proteina BST2, o tetherina, rappresenta il fattore di restrizione dell'ospite in grado di trattenere le particelle completamente formate di HIV-1 sulla superficie delle cellule infettate; è stato riportato inoltre come la proteina accessoria Vpu di HIV-1 si sia evoluta in modo da contrastare l'effetto di BST2, permettendo così al virus di gemmare (Neil *et al.*, 2008).

Molti studi presenti in letteratura dimostrano come esistono numerosi ortologi della proteina umana tetherina in altre specie di mammifero e di come essi risultino funzionali nell'antagonizzare il rilascio di vari virus dotati di *envelope*. In particolare, sono state identificate BST2 nel ratto, nel topo, nella scimmia e negli ovini ed è stato dimostrato che esse siano in grado di interferire con la gemmazione di diversi virus dotati di *envelope* (Arnaud *et al.*, 2009, Goffinet *et al.*, 2009, Kaletsky *et al.*, 2009, Jia *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009)

Al contrario, per quanto riguarda il gatto domestico ed i felini non sono stati riportati studi relativi all'identificazione dell'ortologo felino di tetherina umana. È stata quindi effettuata un'analisi informatica all'interno del genoma del gatto domestico, completamente sequenziato e depositato nel 2007 da Pontius e collaboratori (Pontius *et al.*, 2007).

Sfruttando la piattaforma web di Ensemble Genome Browser (<http://www.ensembl.org>), è stato possibile eseguire una ricerca *blastn* utilizzando come *query* la sequenza nucleotidica codificante la forma umana di *tetherin*. Il risultato è stato il riscontro di un'ipotetica forma di BST2 felina comprensiva della mappa degli esoni che la codificano (GeneID: ENSFCAG00000001009; mRNA: ENSFCAT00000001009; Proteina: ENSFCAP00000000942).

A partire da ciò, è stato interrogato un ulteriore database bioinformatico contenente il genoma del gatto domestico: NCBI Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.gov/mapview/genome/guide/cat>). Tramite la piattaforma web è stato possibile compiere, anche in questo caso, una ricerca *blastn* all'interno del genoma felino utilizzando, in parallelo, le sequenze nucleotidiche della forma umana di *tetherin* e quella ottenuta precedentemente dal database Ensembl. Entrambe le ricerche hanno dato come esito, in modo distinto, il medesimo *contig* ottenuto da *whole genome sequence* con numero di accesso in NCBI ACBE01053987, localizzato a livello del cromosoma A2 del gatto. A partire da questo risultato, tale porzione genomica ottenuta è stata allineata con la sequenza nucleotidica della forma umana di tetherina ed il risultato è stato quindi vagliato manualmente, in modo da identificare nel genoma gli esoni. Tramite comparazione con la forma umana di BST2 è stato possibile prevedere la topologia presunta della forma felina (Figura 7.1).

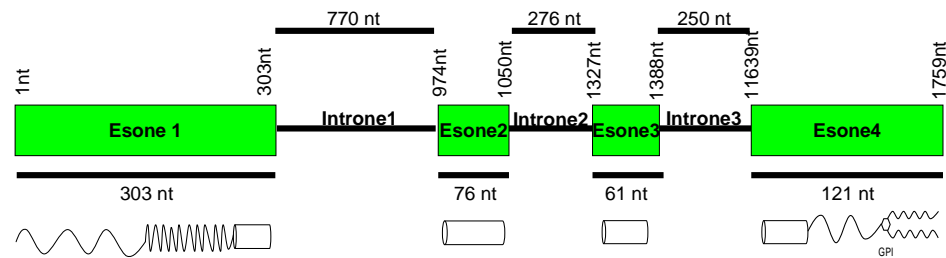
cBST2 (ottenuta da Ensembl/NCBI)

Figura 7.1: Rappresentazione schematica degli introni ed esoni della forma felina di teterina con relativa predizione topologica.

Tale risultato ha permesso il disegno di specifici *primer* che sono stati impiegati per amplificare il prodotto genico di interesse a partire dal cDNA ottenuto in seguito alla retrotrascrizione dell'RNA totale della linea cellulare felina CrFK. Il frammento genico di interesse è stato quindi clonato in un opportuno vettore di espressione eucariotico e la sequenza analizzata mediante sequenziamento (Figura 7.2). Il costrutto è stato nominato cBST2.

SEQUENZA NUCLEOTIDICA (561nt):

```
ATGGCACCTGCTTTTTACCACTATTGGCCTGTGCCAGGACTGACTACTCA
GAGTCAATGGTACCAGGTCGGAGTCTTGGGTGGCAGAGGTGGCTGGGGG
GCTTTCCTGATCCTGGCGGTGCTGGGTCTGTCCGCGGCCCTGGTCATCTT
GTTGTCAAGGCCAACAGCAAAGCCTGCAAGGATGGCCTCCTAGCAGAGGA
GGAGTGTACGGTGTACCCCGCCTCCTGGAGGTCCGGCTAACCCAAGCCT
GGGAAGGCTTACTGAGGAACGAGGTCCAGGCTGCCACCTGCAACAAGACT
TTGGTAACCCTGTTGGCTTCCCTGGAGATTGAGAAGGCCAGAGCCAGGA
GTGGCTCGCGAAAGGGAAGGAGCTTTGGGAGAGATTGAGGAGTTGAAG
CACAAGCTGCAGAACGCTTCGGTGGAGGTGGAAAGACTGAGAAAAGGGA
CTGAGACCTCGAGCAAGAAAAGGAAGTCGCGTCTGCCAGCTCCTTGAAA
GCGCTCAGCCCCTTGGTGGTCTCTGTGCACCTGCTCCTGGCCTTCGTTGC
TCTGCTGGCCTGA
```

SEQUENZA AMINOACIDICA (186aa, 20.5kDa):

```
MAPAFYHYWVPRTDYSESMVPGRSLGWQRWLGGFLILAVLGLSAALVIFVVKANSK
ACKDGLLAEEECHGVTRLLEVRLTQAWEGLLRNEVQAATCNKTLVTLASLEIEKAQS
QEWLAKGKELWGEIEELKHKLQNASVEVERLRKGTETSSKKKEVASASSLKALSPLV
VSVHLLAFVALLA
```

Figura 7.2: Sequenza nucleotidica, ottenuta da sequenziamento, e aminoacidica, predetta con il programma Expsy Tools Translate, di **cBST2**.

La sequenza di cBST2 è stata quindi esaminata mediante una serie di strumenti bioinformatici e paragonata con la forma umana di teterina (Figura 7.3).

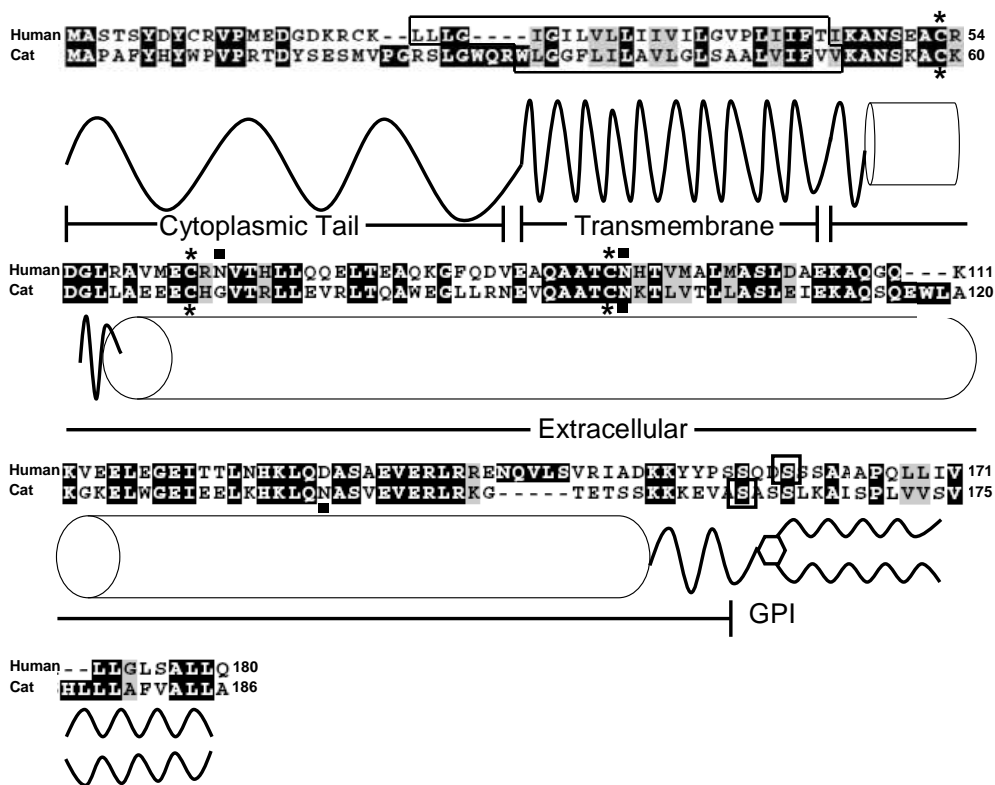


Figura 7.3: Allineamento di teterina umana (*Human*) e felina (*Cat*) con il metodo ClustalW2 e BOXSHADE. Gli aminoacidi in nero sono identici; i residui conservati o simili sono in grigio; gli aminoacidi non correlati sono in bianco. Inoltre sono presenti le caratteristiche strutturali predette mediante analisi informatica. Gli asterischi (*) rappresentano le cisteine conservate, i quadrati (■) i siti di N-glicosilazione e i riquadri vuoti (□) i siti di addizione dell'ancora GPI.

La BST2 felina da noi identificata condivide il 37% di omologia di sequenza aminoacidica con la BST2 umana. Essa presenta gli elementi strutturali tipici della proteina BST2, ovvero possiede una coda citoplasmatica (dall'aminoacido 1 al 30), un dominio transmembrana (dall'aminoacido 31 al 52), un dominio extracellulare (dall'aminoacido 53 al 160) ed, al carbossitermine, il segnale di addizione per il gruppo glicosilfosfatidilinositolo o ancora GPI (posizione 161). cBST2 possiede inoltre 3 cisteine nel dominio extracellulare, presenti anche nel caso della forma umana, e due siti di N-glicosilazione, uno conservato ed uno posto più a valle rispetto a hBST2.

In seguito sono state generate due forme di teterina felina con un opportuno *tag* al fine di permettere la rilevazione della proteina. In particolare, è stato inserito l'epitopo FLAG in posizione aminotermine (costruito rinominato cBST2Flag5') e nella porzione extracellulare (costruito cBST2Flag3') (Figura 7.4).

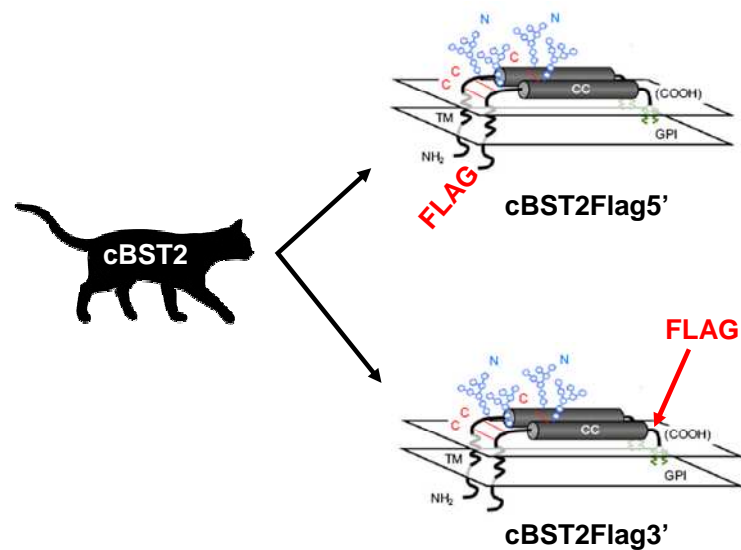


Figura 7.4: Rappresentazione schematica di teterina felina *full length* con epitopo Flag localizzato nella regione aminoterminale (pannello superiore) ed a valle del dominio extracellulare (*ectodomain*) (pannello inferiore) (da Perez-Caballero *et al.*, 2009, modificata).

La scelta della posizione per il *tag* alla fine dell'*ectodomain* non è stata semplice in quanto non vi sono a disposizione alcune informazioni né strutturali né da precedenti studi. Inoltre, la collocazione di tale epitopo può risultare critica per la funzionalità della proteina. Infatti, sia la regione dell'*ectodomain* che il segnale di inserimento del gruppo glicosilfosfatidilinositolo, ma anche la corretta spaziatura fra questi due elementi, riveste un ruolo importante nella capacità antivirale di BST2 umana (Neil *et al.*, 2008, Perez-Caballero *et al.*, 2009). Analizzando la regione carbossiterminale di cBST2 e comparandola con quella della forma umana (Hinz *et al.*, 2010) è stato possibile identificare, mediante analisi bioinformatica, un possibile sito per l'inserimento dell'epitopo. Quest'ultimo è stato quindi posizionato in una regione non strutturale (posizione aminoacidica 150) tra la fine del dominio extracellulare e l'inizio del sito per l'addizione dell'ancora GPI, ricapitolando quanto è stato fatto precedentemente per la forma umana o per la forma ovina (Neil *et al.*, 2008, Arnaud *et al.*, 2009). A partire dai costrutti cBST2Flag5' e cBST2Flag3', sono state generate le relative controparti prive del segnale di addizione del gruppo glicosilfosfatidilinositolo, cBST2ΔGPIFlag5' e cBST2ΔGPIFlag3' (Figura 7.5). Questi costrutti risultano idonei per caratterizzare la funzionalità della forma *full length* di teterina in quanto la presenza di entrambe le regioni codificanti le ancore transmembrana (dominio transmembrana e ancora GPI) sono un prerequisito essenziale per la sua corretta attività antivirale (Neil *et al.*, 2008, Perez-Caballero *et al.*, 2009).

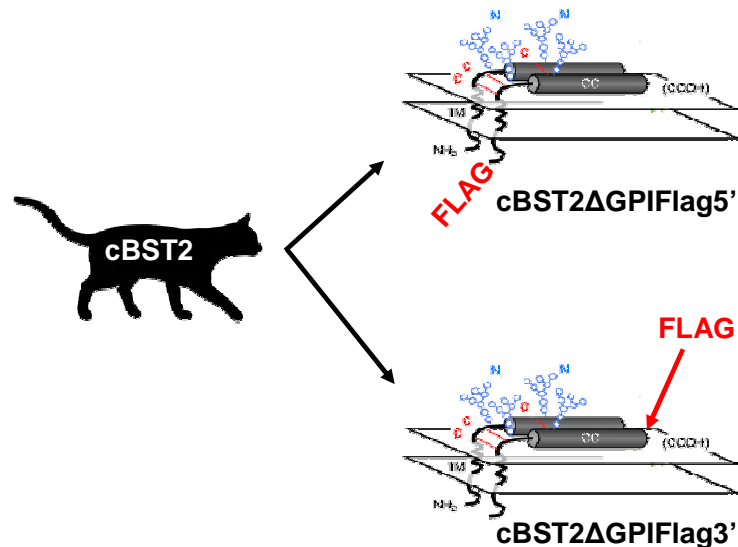


Figura 7.5: Rappresentazione schematica di teterina felina priva dell'ancora GPI, con epitopo Flag localizzato nella regione aminoterminale (pannello superiore) ed a valle del dominio extracellulare (*ectodomain*) (pannello inferiore) (da Perez-Caballero *et al.*, 2009, modificata).

E' stata clonata anche la forma umana di hBST2 al fine di utilizzarla come controllo. A partire dalla sequenza presente nel database di NCBI Entrez Gene (GeneID: 684; Cromosoma: NC_000019; mRNA: NM_004335; Proteina: NP_004326) sono stati disegnati gli opportuni *primer*. Dopo estrazione dell'RNA dalla linea cellulare umana HeLa, esprime elevati livelli di BST2 endogena (Neil *et al.*, 2008), l'RNA totale, trattato precedentemente con DNAsiI, è stato retrotrascritto e sottoposto a PCR diretta. Il frammento genico di interesse è stato clonato in un opportuno vettore di espressione eucariotico e controllato mediante sequenziamento (Figura 7.6).

SEQUENZA NUCLEOTIDICA (543 bp):

```
ATGGCATCTACTTCGTATGACTATTGCAGAGTGCCCATGGAAGACGGG
GATAAGCGCTGTAAGCTTCTGCTGGGGATAGGAATTCTGGTGCTCCTG
ATCATCGTGATTCTGGGGGTGCCCTTGATTATCTTCACCATCAAGGCC
AACAGCGAGGCCTGCCGGGACGGCCTTCGGGCAGTGATGGAGTGTG
GCAATGTCACCCATCTCCTGCAACAAGAGCTGACCGAGGCCCAGAAG
GGCTTTCAGGATGTGGAGGCCAGGCCGCCACCTGCAACCACACTGT
GATGGCCCTAATGGCTTCCCTGGATGCAGAGAAAGCCCAAGGACAAA
GAAAGTGGAGGAGCTTGAGGGAGAGATCACTACATTAACCATAAGCTT
CAGGACGCGTCTGCAGAGGTGGAGCGACTGAGAAGAGAAAACCAGGT
CTTAAGCGTGAGAATCGCGGACAAGAAGTACTACCCCAGCTCCCAGGA
CTCCAGCTCCGCTGCGGCGCCCCAGCTGCTGATTGTGCTGCTGGGCC
TCAGCGCTCTGCTGCAGTGA
```

SEQUENZA AMINOACIDICA (180aa, 19.7 kDa):

```
MASTSYDYCRVPMEDGDKRCKLLLGIGILVLLIIVILGVPLIIFTIKANSEACRD
GLRAVMECRNVTHLLQQLTEAQKGFQDVEAQAATCNHTVMALMASLDA
EKAQGQKQVEELEGEITTLNHLQDASAEVERLRRENQVLSVRIADKYYYP
SSQDSSSAAPQLLIVLLGLSALLQ
```

Figura 7.6: Sequenza nucleotidica, ottenuta da sequenziamento, e aminoacidica, predetta con il programma Expaty Tools Translate, di **hBST2**.

Come nel caso di cBST2, sono state generate due forme di hBST2 contenenti un opportuno *tag*. Basandosi su studi precedenti (Neil *et al.*, 2008, Jouvenet *et al.*, 2009), è stato inserito l'epitopo FLAG in posizione aminoterminale (costrutto rinominato hBST2Flag5') o nella porzione extracellulare (costrutto hBST2Flag3') (Figura 7.7), fra la fine dell'*ectodomain* e l'inizio del segnale di riconoscimento per l'aggiunta del gruppo glicosilfosfatidilinositolo (posizione aminoacidica 154).

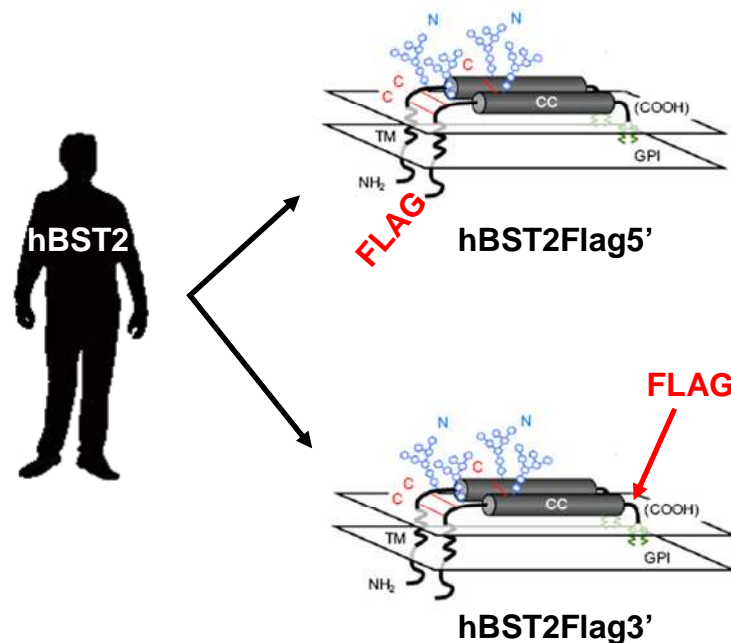


Figura 7.7: Rappresentazione schematica di tetraquina umana con epitopo Flag localizzato nella regione aminoterminale (pannello superiore) ed a valle del dominio extracellulare (*ectodomain*) (pannello inferiore) (da Perez-Caballero *et al.*, 2009, modificata).

E' stata quindi valutata l'espressione delle diverse forme di tetraquina felina ed umana in cellule 293T, che non possiedono livelli endogeni di hBST2 significativi (Neil *et al.*, 2008). A tale scopo, cellule 293T sono state trasfettate con i plasmidi cBST2Flag3', cBST2Flag5', hBST2Flag5' e hBST2Flag3'. A distanza di 24 ore dalla trasfezione, i lisati proteici sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliaccrilamide e successivo Western Blotting mediante anticorpo diretto contro l'epitopo Flag.

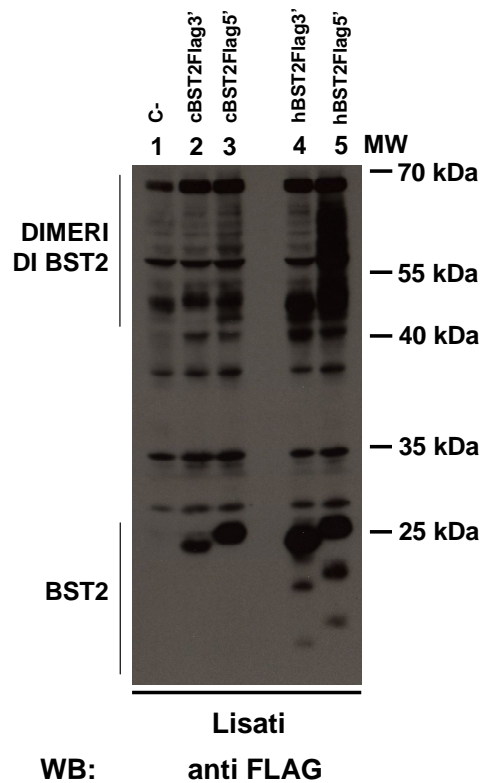


Figura 7.8: Cellule 293T sono state trasfettate con i costrutti pCDNA3.1 (corsia 1, C-), cBST2Flag3' (corsia 2, cBST2Flag3'), cBST2Flag5' (corsia 3, cBST2Flag5'), hBST2Flag3' (corsia 4, hBST2Flag3') e hBST2Flag5' (corsia 5, hBST2Flag5'). Dopo 24 ore dalla trasfezione i lisati cellulari (Lisati) sono stati analizzati in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa

In figura 7.8 è possibile osservare come entrambe le forme di teterina, sia felina che umana, siano espresse correttamente. Studi riportati in letteratura hanno dimostrato come la teterina umana sia presente anche sottoforma di dimeri (Ohtomo *et al.*, 1999). Come si può osservare dalla figura, la hBST2 è in grado di dimerizzare. Interessante da notare invece come la forma felina sembra essere espressa in forma dimerica.

Successivamente, è stata quindi saggiata la capacità antivirale di hBST2 nell'interferire con il rilascio delle particelle di HIV-1, in presenza ed assenza dell'antagonista virale Vpu (Neil *et al.*, 2008).

Per questo, cellule 293T sono state cotrasfettate con i plasmidi hBST2Flag3' e hBST2Flag5' unitamente o meno ad i costrutti pSVC21Vpu⁺ e pSVC21, esprimenti l'intero genoma di HIV-1 (clone molecolare HXBc2) in associazione (pSVC21Vpu⁺) o meno (pSVC21) della proteina accessoria Vpu.

A distanza di 24 ore dalla trasfezione, i campioni proteici, lisati e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting mediante anticorpo diretto contro la proteina p24 Gag di HIV-1.

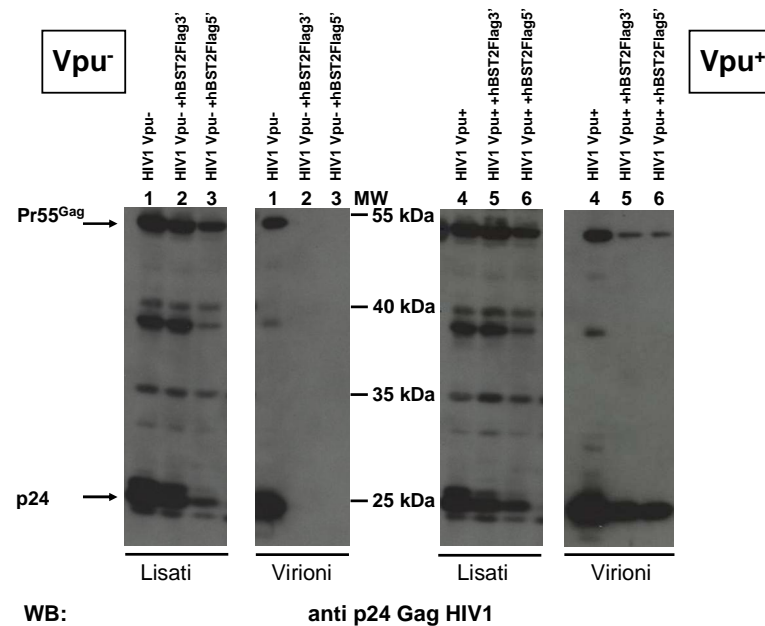


Figura 7.9: Cellule 293T sono co-trasfettate con pSVC21 (pannello di sinistra, HIV-1 Vpu-) o pSVC21Vpu+ (pannello di destra, HIV-1 Vpu+) come indicato, in assenza (corsia 1) o in presenza di hBST2Flag3' (corsia 2) o hBST2Flag5' (corsia 3). Dopo 24 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle virali (Virioni) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di HIV-1. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Dalla figura 7.9 è possibile osservare, in accordo con la letteratura (Neil *et al.*, 2008), come entrambe le forme di hBST2 siano funzionali ed in grado di bloccare il rilascio di HIV-1 in assenza della proteina accessoria Vpu (corsie 2 e 3, virioni). Quando presente invece, essa è in grado di antagonizzare hBST2, permettendo così un'efficiente gemmazione di HIV-1 (corsie 5 e 6, virioni).

7.2 Valutazione della capacità antivirale di teterina felina

E' ormai ampiamente dimostrato come il fattore antivirale teterina sia in grado di bloccare il rilascio delle particelle virali dotate di *envelope* dalle cellule infettate e di come questi virus abbiano evoluto meccanismi specie-specifici per antagonizzarne l'effetto (Sauter *et al.*, 2010, Evans *et al.*, 2010).

Data la funzione antivirale conservata delle diverse teterine identificate fino ad ora, è stata testata l'attività dell'ortologo identificato nel genoma felino nei confronti di un virus che normalmente non infetta il gatto domestico, in particolare HIV-1. In tale condizione è possibile quindi valutare la capacità di cBST2 di interferire nel rilascio delle particelle virali di HIV-1 per effetto della specie-specificità. Come controllo, è stata utilizzata la forma umana.

A tale scopo, cellule 293T sono state co-trasfettate con i plasmidi pSVC21 e pSVC21Vpu⁺ in presenza di cBST2Flag3', hBST2Flag3' o di cBST2Flag3'ΔGPI. A distanza di 24 ore, i campioni proteici ottenuti, lisati e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting mediante anticorpo diretto contro la proteina p24 Gag di HIV-1.

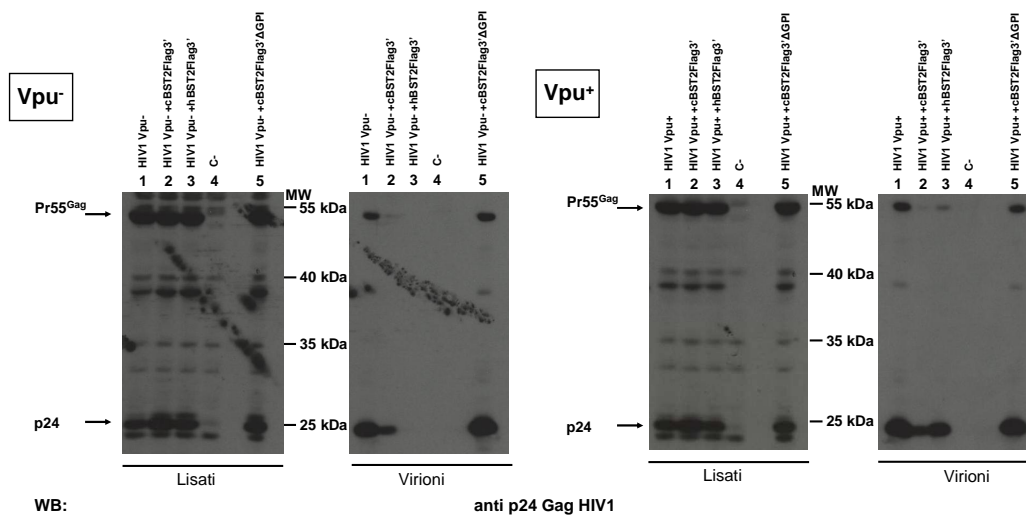


Figura 7.10: Cellule 293T sono co-trasfettate con pSVC21 (pannello di sinistra, HIV-1 Vpu-) o pSVC21Vpu⁺ (pannello di destra, HIV-1 Vpu⁺) come indicato, in presenza (corsia 1) o in assenza di cBST2Flag3' (corsia 2), hBST2Flag3' (corsia 3) o cBST2Flag3'ΔGPI (corsia 5). C-: controllo negativo (corsia 4). Dopo 24 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle virali (Virioni) sono state analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di HIV-1. MW: marker di peso molecolare PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come è possibile osservare dalla figura 7.10, cBST2 è in grado di bloccare il rilascio di HIV-1, sia nel contesto Vpu⁺ che Vpu⁻ (corsia 2, pannello a sinistra e a destra, virioni), anche se con un'efficienza inferiore rispetto a quella riscontrata in presenza di teterina umana (corsia 3, pannello a sinistra e a destra, virioni). Inoltre teterina felina *full length* risulta essere più efficiente rispetto alla corrispettiva forma priva dell'ancora GPI (corsia 5, pannello a sinistra e a destra, virioni). Quindi i dati suggeriscono la capacità di cBST2 di ridurre il rilascio di HIV-1.

7.3 Localizzazione cellulare di cBST2

E' stato ampiamente dimostrato come nelle diverse specie la proteina BST2 risieda in modo predominante a livello della membrana plasmatica e in compartimenti intracellulari corrispondenti agli endosomi tardivi (CD63+) (Kupzing *et al.*, 2003, Neil *et al.*, 2007, Neil *et al.*, 2008). Inoltre, è noto come

l'azione antivirale di teterina si espliciti sulla superficie cellulare, andando a trattenere i virioni maturi proprio a questo livello (Neil *et al.*, 2008).

Si è voluto quindi esaminare la localizzazione di cBST2 a livello della superficie cellulare. A tale scopo, cellule 293T sono state seminate su appositi vetrini e trasfettate con la forma felina di teterina con il *tag* localizzato nella porzione extracellulare dell'*ectodomain* (cBST2Flag3'). Come controllo è stata utilizzata hBST2 (hBST2Flag3'). Dopo 24 ore, le cellule sono state fissate e processate per l'analisi in immunofluorescenza utilizzando un anticorpo primario diretto contro l'epitopo Flag ed un secondario coniugato al fluoroforo FITC. I vetrini sono stati visualizzati al microscopio confocale.

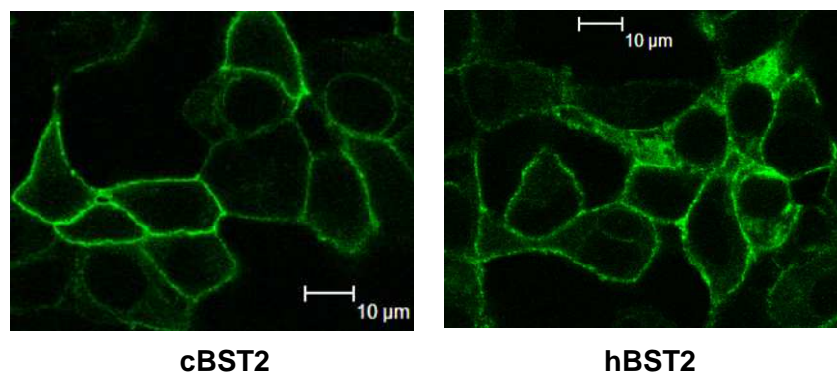


Figura 7.11: Cellule 293T sono trasfettate con cBST2Flag3' (pannello cBST2) o hBST2Flag3' (pannello hBST2). Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state fissate e processate per l'immunofluorescenza. In figura è presente la scala (10μm).

Dalla figura 7.11 è possibile osservare come la proteina felina teterina (pannello di sinistra, cBST2) si localizzi in modo evidente a livello della superficie cellulare, in accordo con la forma umana (pannello di destra, hBST2) e con i dati riportati in letteratura (Kupzing *et al.*, 2003, Neil *et al.*, 2008).

7.4 Dimerizzazione di cBST2

La forma umana di teterina è in grado di dimerizzare attraverso le tre cisteine (C53, C63, C91) presenti a livello del dominio extracellulare (Ohtomo *et al.*, 1999). Tale proprietà sembra essere critica per l'inibizione da parte di hBST2 del rilascio delle particelle di HIV-1, ma non risulta essenziale per la sua l'espressione sulla superficie cellulare (Perez-Caballero 2009).

E' stato quindi verificato se anche BST2 felina fosse capace di formare dimeri, in quanto anche essa presenta tre residui cisteina in posizione 59, 69 e 97 dell'*ectodomain*. Cellule 293T sono state trasfettate con i costrutti esprimenti la

teterina felina nella forma *full length* (cBST2Flag5') o priva dell'ancora GPI (cBST2ΔGPIFlag5') e, come controllo, la forma umana di BST2 (hBST2Flag5'). A distanza di 24 ore, i lisati cellulari proteici ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide in condizioni riducenti (+ β-mercaptoetanolo) e non riducenti (- β-mercaptoetanolo) e successivo Western Blotting con anticorpo diretto contro l'epitopo Flag.

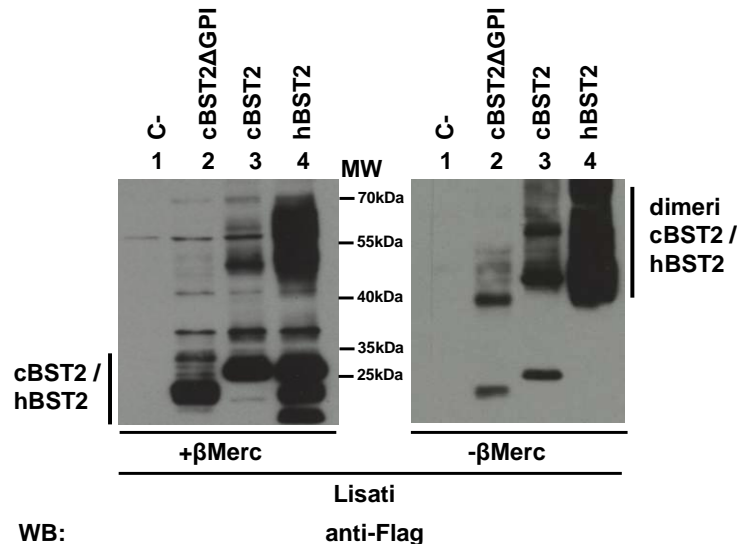


Figura 7.12: Cellule 293T sono state trasfettate con i costrutti pCDNA3.1 (corsia 1, C-), cBST2Flag5'ΔGPI (corsia 2, cBST2ΔGPI), cBST2Flag5' (corsia 3, cBST2) o hBST2Flag5' (corsia 4, hBST2). Dopo 24 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) sono stati caricati in gel SDS-PAGE in condizioni riducenti (pannello di sinistra, +βMerc) o non riducenti (pannello di destra, -βMerc) ed in seguito analizzati in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

In figura 7.12, dopo aver verificato la corretta espressione delle BST2 (pannello di sinistra, + βmerc), è possibile osservare come la forma felina di teterina sia in grado di formare dimeri (cBST2, corsia 3, - βmerc) e di come essa non richieda l'ancora GPI per tale processo (cBST2ΔGPI, corsia 4, - βmerc). Inoltre, dalla figura si può notare come l'efficienza di formazione dei dimeri di cBST2 sia inferiore a quella della forma umana (hBST2, corsia 4, - βmerc).

7.5 Attività antivirale di teterina felina nei confronti del Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV)

Successivamente, è stata valutata la capacità della teterina felina di antagonizzare il rilascio delle particelle virali del lentivirus che infetta naturalmente il gatto domestico: FIV. A tale scopo, è stato utilizzato un costrutto esprimente il genoma

wild type di FIV petaluma 34TF10 (codice accesso NCBI: NC_001482), con le LTR al 5' e al 3' sostituite rispettivamente dal promotore del Cytomegalovirus (CMV) e dal segnale di poli-adenilazione dell'ormone della crescita bovino (BGH), al fine di ovviare i problemi legati alla limitata espressione delle LTR di FIV in cellule umane (Mustafa *et al.*, 2005).

Cellule 293T sono state pertanto co-trasfettate con il costrutto p Δ LTR in presenza o meno dei plasmidi esprimenti cBST2Flag3' o hBST2Flag3'. A distanza di 24 ore, i campioni proteici ottenuti, lisati e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting con anticorpo diretto contro la proteina p24 Gag di FIV. In parallelo è stata valutata l'espressione intracellulare della proteina cBST2Flag3' e hBST2Flag3' mediante Western Blotting con anticorpo diretto contro l'epitopo Flag.

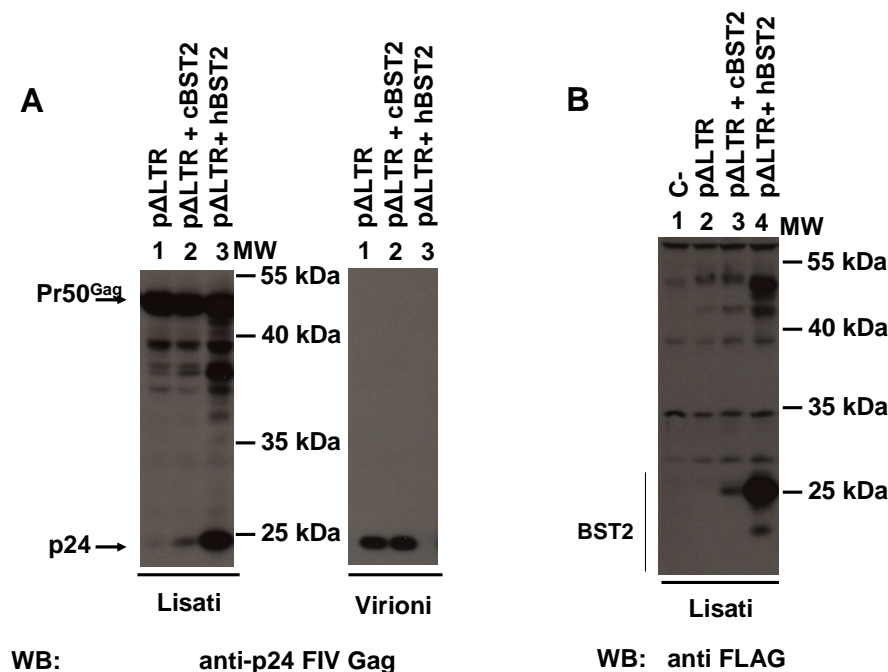


Figura 7.13: Cellule 293T sono co-trasfettate con p Δ LTR come indicato, da singolarmente (corsia 1 pannello A; corsia 2 pannello B) o in combinazione con cBST2Flag3' (corsia 2 pannello A; corsia 3 pannello B) o hBST2Flag3' (corsia 3 pannello A; corsia 4 pannello B). C-: controllo negativo (corsia 1 pannello B) Dopo 24 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle virali (Virioni) sono analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro A) la p24 di Gag di FIV e B) l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

I dati riportati in figura 7.13 sembrano indicare che la forma felina di teterina non abbia effetto (pannello A, corsia 2, virioni) sul rilascio di FIV, a differenza di quanto accade per HIV-1 (Figura 8.10, corsia 2, virioni), nonostante la proteina sia correttamente espressa nelle cellule (pannello B, corsia 3). In particolare, è possibile notare come l'efficienza di gemmazione di questo virus non sia per nulla

influenzata dalla presenza di cBST2. Tale risultato sembrerebbe indicare che FIV possieda un antagonista virale in grado di antagonizzare l'effetto della proteina teterina felina. E' interessante notare invece come la BST2 umana (corsia 3, virioni) impedisca il rilascio dei virioni di FIV e come questo virus, che in natura infetta i non primati, non sia in grado di contrastarne l'effetto mediante l'espressione di una proteina virus-specifica.

7.6 Ricerca di un fattore virale in FIV in grado di antagonizzare l'effetto di teterina felina: Envelope e Orf-A

I risultati finora ottenuti ipotizzano l'esistenza di un antagonista virale in FIV in grado di interferire con l'attività della teterina felina. Mentre nel contesto dell'infezione da parte di HIV-1 è la proteina accessoria Vpu a contrastare l'effetto di BST2, le evidenze sperimentali riscontrate nel caso di SIV e HIV-2 identificano la proteina Env come il fattore virale in grado di delocalizzare BST2 permettendo così il rilascio dei virioni (Bour *et al.*, 2009, Gupta *et al.*, 2009, Le Tortorec *and* Neil, 2009). Dal momento che il genoma di FIV non codifica la proteina accessoria Vpu, è stato inizialmente valutato il contributo della proteina strutturale Env.

Per indagare tale aspetto, è stato sviluppato il costrutto pΔLTREnvFR1, derivato da pΔLTR, ma con il prodotto del gene *env* reso non funzionale dall'introduzione di un *frameshift*. Cellule 293T sono state quindi cotrasfettate con pΔLTR o pΔLTREnvFR1 in presenza o meno dei plasmidi espressioni cBST2Flag3' o hBST2Flag3'. Dopo 24 ore, i campioni proteici ottenuti, lisati e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilamide e successivo Western Blotting mediante l'impiego dell'anticorpo diretto contro la proteina p24 Gag di FIV. In parallelo è stata valutata l'espressione intracellulare delle proteina cBST2Flag3' e hBST2Flag3' tramite Western Blotting utilizzando un anticorpo diretto contro l'epitopo Flag.

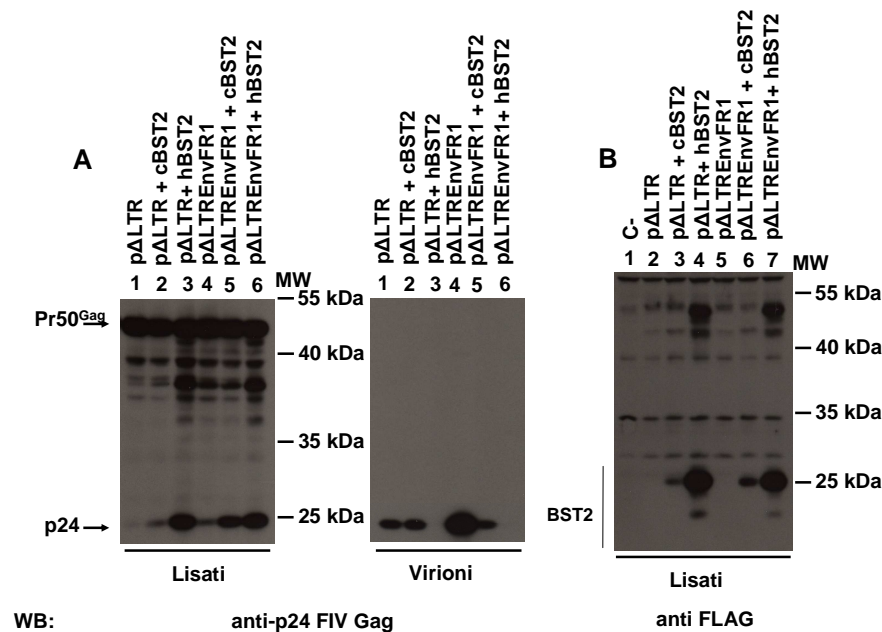


Figura 7.14: Cellule 293T sono co-trasfettate con pΔLTR o pΔLTREnvFR1 come indicato, singolarmente (corsie 1 e 4, pannello A; corsia 2 e 5 pannello B) o in combinazione con cBST2Flag3' (corsia 2 e 5 pannello A; corsia 3 e 6 pannello B) o hBST2Flag3' (corsia 3 e 6 pannello A; corsia 4 e 7 pannello B). C-: controllo negativo (corsia 1 pannello B). Dopo 24 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle virali (Virioni) sono analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro **A**) la p24 di Gag di FIV e **B**) l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come è possibile osservare dalla figura 7.14, in assenza del prodotto del gene *env* cBST2 è in grado di interferire nel rilascio di FIV (corsia 5, pannello A, virioni) con elevata efficienza.

Questi dati suggeriscono che la proteina strutturale Env di FIV rappresenta un potenziale antagonista virale di cBST2. E' interessante notare come BST2 umana impedisca il rilascio dei virioni di FIV anche nel caso del mutante di FIV privo di Env (corsia 6, pannello A, virioni).

E' noto come la proteina accessoria Orf-A di FIV, detta anche Orf-2, svolga molteplici funzioni nel ciclo replicativo di questo virus non ancora completamente chiarite, ma simili a quelle attribuite alle proteine accessorie Vpr, Vpu e Vif di HIV-1 (Gemeniano *et al.*, 2004). In particolare, è stato evidenziato un suo coinvolgimento nelle fasi tardive del ciclo replicativo (Gemeniano *et al.*, 2003).

Al fine di valutare il contributo di Orf-A quale antagonista virale nei confronti di teterina felina, è stato ottenuto il costrutto pΔLTRorfAStop, derivato da pΔLTR, caratterizzato dal gene *orf-A* reso non funzionale in seguito ad introduzione di un codone di stop dopo l'ATG. Inoltre, è stato generato un ulteriore costrutto,

p Δ LTRorfAStopEnvFr1, che combina le mutazioni precedentemente descritte a livello di Env e Orf-A, al fine di analizzare la possibilità che entrambe queste proteine agiscano sinergicamente nell'antagonizzare l'effetto di cBST2.

Cellule 293T sono state quindi cotrasfettate con p Δ LTR, p Δ LTREnvFR1 o p Δ LTRorfAStop e p Δ LTRorfAStopEnvFR1 in presenza o meno dei plasmidi esprimenti cBST2Flag3' o hBST2Flag3'. Dopo 24 ore, i campioni proteici ottenuti, lisati e sovranatanti, sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliaccrilamide e successivo Western Blotting mediante anticorpo diretto contro la proteina p24 Gag di FIV.

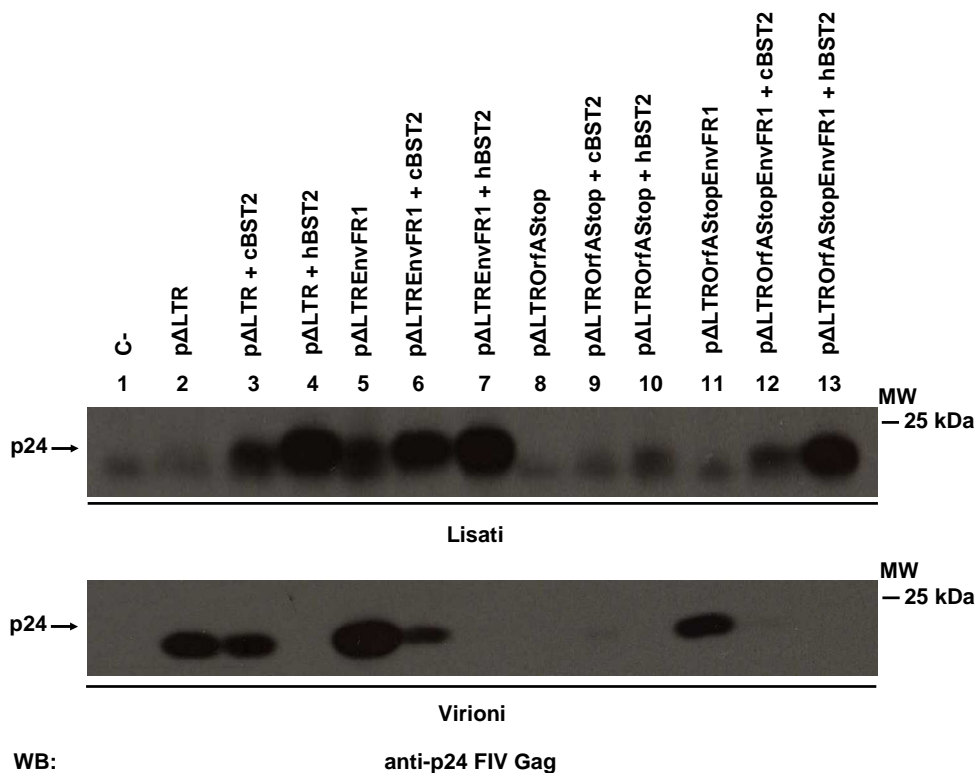


Figura 7.15: Cellule 293T sono co-trasfettate con p Δ LTR, p Δ LTREnvFR1, p Δ LTRorfAStop o p Δ LTRorfAStopEnvFR1 come indicato, singolarmente (corsie 2, 5, 8 e 11) o in combinazione con cBST2Flag3' (corsia 3, 6, 9 e 12) o hBST2Flag3' (corsia 4, 7, 10 e 13). C-: controllo negativo (corsia 1). Dopo 24 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle virali (Virioni) sono analizzate in Western Blot utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la p24 di Gag di FIV. MW: marker di peso molecolare PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Dalla figura 7.15 è possibile notare come in assenza della proteina strutturale Env e della proteina accessoria Orf-A, cBST2 sia in grado di impedire il rilascio di FIV (corsia 12 virioni) con elevata efficienza, paragonabile a quella ottenuta in presenza dalla forma umana di teterina (corsia 13 virioni). Per quanto riguarda il contributo della sola proteina accessoria Orf-A invece, non è possibile inferire

sulla sua potenziale azione nel contrastare teterina felina (corsia 9 virioni) in quanto il costrutto recante tali mutazioni risulta essere poco funzionale nel mediare il rilascio di particelle virali (corsia 8 virioni).

8. DISCUSSIONE

Diversi aspetti molecolari e patogenetici rendono il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) un modello attraente per la ricerca dell'AIDS. Nonostante a livello genomico presentino differenze significative, FIV e il Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 (HIV-1) sono accumulati da numerose similarità a livello del ciclo biologico e dei meccanismi patogenetici. Inoltre, FIV è stato proposto come modello non solo per testare nuovi farmaci contro HIV-1 e per analizzare in maggior dettaglio i fenomeni di resistenza ma anche per il disegno di vaccini. L'identificazione di meccanismi che sono condivisi o altamente divergenti tra questi due virus ha profonde implicazioni: per l'impiego del gatto domestico come modello non primate per l'AIDS e per i requisiti molecolari alla base dello sviluppo di vettori FIV-basati per la terapia genica (Luttge *et al.*, 2008).

Date le significative potenzialità e la rilevanza di FIV per la ricerca sull'AIDS, in questi anni sono stati compiuti numerosi progressi atti ad identificare i meccanismi molecolari alla base dell'infezione, in parte basati su studi comparativi condotti su HIV-1 ed altri lentivirus. In tale contesto, restano ancora da delucidare in maggior dettaglio gli eventi tardivi del suo ciclo vitale, in particolare la fase di gemmazione.

Nella prima parte del progetto di ricerca svolto durante questo dottorato sono state caratterizzate le interazioni tra proteine virali/cellulari coinvolte nelle fasi finali del ciclo replicativo di FIV, nonché il *pathway* attraverso cui FIV fuoriesce dalla cellula infettata.

Interazioni tra retrovirus e *pathway* cellulari sono evidenti ad ogni stadio della replicazione virale, in particolare a livello di assemblaggio/rilascio dei virioni dalla cellula infettata. L'espressione della poliproteina Gag (che codifica le proteine strutturali del virus), in assenza di ogni altra proteina virale, porta alla formazione di particelle simil-virali (VLPs) in grado di gemmare dalle cellule (Göttlinger *et al.*, 1991). Il processo di assemblaggio è guidato principalmente da elementi interni a Gag, come il dominio di indirizzamento alla membrana (M), il dominio di interazione Gag-Gag (I) necessario per la formazione delle particelle, e i domini tardivi (domini L o *late domain*) necessari per il distacco del virione dalla membrana della cellula ospite. In particolare, a livello di Gag così come di altre proteine strutturali di virus ad RNA dotati di *envelope*, sono stati descritti tre domini tardivi, definiti canonici PPXY, P(T/S)AP and YP(X)nL (Calistri *et al.*, 2009b). Mutazioni che interferiscono con le normali funzioni di questi corti

motivi amminoacidici impediscono la loro interazione con specifici fattori cellulari che intervengono nella biogenesi dei *multivesicular bodies* (MVB) e nel *trafficking* proteico. E' stato dimostrato che i) le ubiquitino-ligasi della famiglia Nedd4-like legano il motivo PPXY; ii) il tumor suppressor gene 101 (TSG101) lega il motivo P(T/S)AP; iii) AIP1/Alix lega il motivo YP(X)nL (Calistri *et al.*, 2009b). Nonostante per alcuni virus un singolo dominio tardivo sia sufficiente per il rilascio delle particelle, molti virus presentano domini L multipli, e in tale contesto uno ricopre il ruolo principale in maniera solitamente cellulo-specifica. Questo suggerisce che la presenza di più di un dominio L sia necessario per rendere efficiente il rilascio dei virioni nei diversi tipi cellulari infettati *in vivo*.

La poliproteina Gag di FIV è contraddistinta da un'elevata variabilità del peptide carbossiterminale p2, che corrisponde al p6 in HIV-1. Nonostante ciò, il dominio tardivo PSAP sembra essere altamente conservato (Manrique *et al.*, 2004). A partire da queste osservazioni, nel nostro laboratorio è stata prodotta una serie di mutanti, ingegnerizzando la poliproteina strutturale Gag di FIV, che come è noto, è in grado di assemblarsi e gemmare dalle cellule, in assenza di qualunque altro fattore virale (Göttlinger *et al.*, 1991). I diversi mutanti sono stati testati su due linee cellulari: cellule CrFK, fibroblasti della porzione corticale del rene di gatto che rappresentano le cellule di elezione per lo studio di FIV in quando derivano dal suo ospite naturale, e cellule 293T, cellule embrionali di rene umano che permettono un'elevata espressione proteica e normalmente vengono utilizzate per lo studio di aspetti legati alla gemmazione di HIV-1. L'utilizzo di due linee cellulari di origine diversa ha permesso inoltre sia di valutare eventuali fenomeni cellulo/specie-specifici sia di analizzare il contributo di fattori cellulari coinvolti in particolari fasi del ciclo replicativo virale.

Sono stati ottenuti quattro costrutti caratterizzati dalla sostituzione di uno (Mut01, ASAP) o di entrambi (Mut02, ASAA) i residui di prolina del motivo PSAP con alanina, in combinazione o meno con l'introduzione di un codone di stop al posto dell'amminoacido in posizione 10 della proteasi. In questo modo è stato possibile dimostrare come il motivo PSAP sia essenziale per il rilascio delle particelle virali e come la sostituzione di entrambe le proline con alanina (Mut02, ASAA) porti ad una significativa inattivazione della funzionalità del motivo stesso in modo indipendentemente dalla linea cellulare considerata. Interessante osservare come, in contrasto con quanto avviene in HIV-1, la mutazione a livello della sola prima prolina di PSAP (ASAA) non sia sufficiente per compromettere il rilascio di particelle virali. Si è voluto, successivamente, analizzare il comportamento dei mutanti Mut01 e Mut02 anche in assenza di proteasi attiva. Infatti, in HIV-1 è stato dimostrato come vi sia un legame funzionale tra la regione p6 ed il

processamento proteolitico del precursore Gag nella fase di rilascio della progenie virale. In particolare, la mancanza di proteasi attiva porta ad un recupero della capacità di gemmare di costrutti difettivi a livello del dominio tardivo (Huang *et al.*, 1995). In contrasto con HIV-1, l'inattivazione del motivo PSAP in FIV ha un forte impatto anche in assenza di proteasi attiva.

A partire dai dati ottenuti, si è voluto studiare se il *pathway* dei MVB giocasse un ruolo determinante nella gemmazione di FIV. In particolare, è stata utilizzata una forma dominante negativa della proteina cellulare ATPasi Vps4, essenziale per la biogenesi dei MVB, in grado di inibire la formazione delle vescicole che, gemmando negli endosomi, portano alla formazione dei MVB. Tali mutanti inoltre sono in grado di arrestare il processo di gemmazione di virus recanti domini tardivi di classe diversa (Calistri *et al.*, 2009b), senza identificare la fase esatta del *pathway* espressamente interessata. I risultati dimostrano come vi sia un significativo blocco del rilascio di VLPs da parte delle cellule esprimenti il dominante negativo di Vps4, indipendentemente dal *Late domain* analizzato e dalla funzionalità o meno della proteasi virale. Questo dimostra il coinvolgimento del *pathway* dei MVB nella gemmazione di FIV.

Dagli esperimenti appena descritti e da altri esperimenti condotti nel nostro laboratorio, è stato osservato come nelle VLPs di FIV siano visibili bande di Gag ad alto peso molecolare, in particolare nel caso di costrutti mutanti di FIV contenenti il codone di stop al posto dell'aminoacido 10 della proteasi, e di come esse siano correlate alla funzionalità del dominio tardivo. Studi riportati in letteratura hanno dimostrato la presenza di forme modificate di Gag nelle VLPs di diversi retrovirus (Strack *et al.*, 2000), correlate in particolare con la funzionalità dei domini tardivi, che rappresentano forme dello stesso coniugate all'ubiquitina. E' stato possibile confermare quindi che le bande ad alto peso molecolare di Gag sono le forme dello stesso coniugate ad ubiquitina e di come esse siano indotte in presenza dell'*L domain* funzionale. La considerazione che il Gag *wild type* di FIV è ubiquitinato in maniera evidente costituisce un'ulteriore risultato a favore del fatto che questo virus, così come altri virus ad RNA dotati di *envelope*, utilizza il *pathway* dei MVB per gemmare dalla cellula infettata (Martin-Serrano *et al.*, 2004, Strack *et al.*, 2003)

A partire dalla dimostrazione che il mutante Mut02, caratterizzato dalla sequenza del *late domain* PSAP distrutta (ASAA), è completamente incapace di rilasciare VLPs, nel tentativo di caratterizzare ulteriormente il ruolo dell'intera regione p2 nella gemmazione di FIV, è stato osservato che la capacità di tale mutante poteva essere ripristinata over-esprimendo nelle stesse cellule la proteina cellulare AIP1/Alix.

Significativamente, è stato possibile identificare all'interno della regione p2 un motivo LLDL a valle del *late domain* PSAP, che ricorda il dominio tardivo YPDL (Puffer *et al.*, 1997), coinvolto nell'interazione di AIP1/Alix in EIAV (Puffer *et al.*, 1997, Strack *et al.*, 2003). Per verificare se tale motivo avesse la funzione di dominio tardivo per FIV, sono stati sviluppati una serie di mutanti che presentano il *late domain* PSAP *wild type* in combinazione alla distruzione progressiva del motivo LLDL (PSAP-LLAL, PSAP-ALAL, PSAP-AAAL e PSAP-AAAA). Dall'analisi del rilascio delle VLPs è stato possibile evidenziare come tale motivo non rappresenti un *late domain* per FIV, in quanto la sua completa distruzione non ha alcun effetto sulla capacità di gemmazione. Questi dati, da un lato confermano il ruolo essenziale svolto dal dominio PSAP, dall'altro non escludono che il motivo LLDL possa avere una funzione nella maturazione/gemmazione virale, almeno in specifiche condizioni.

Come noto, nonostante PSAP in HIV-1 sia fondamentale per il rilascio delle particelle virali, il motivo YPLTSL, anch'esso presente in p6 Gag, funziona come *late domain* ausiliario e media, in alcuni casi, il coinvolgimento di AIP1/Alix nel rilascio di HIV-1 (Strack *et al.*, 2003). Inoltre, è stato riportato che mutanti di HIV-1 privi del sito di legame per TSG101 in p6 Gag, esibiscono difetti nella produzione di VLPs, implicando che il *late domain* ausiliario YPLTSL non è sufficiente per mediare la gemmazione virale (Usami *et al.*, 2007). In contrasto, il loro rilascio può essere ripristinato aumentando il livello di espressione cellulare di AIP1, in modo dipendente dall'integrità del sito di legame per AIP1/Alix nella regione p6 (Usami *et al.*, 2007, Popov *et al.*, 2008, Dussupt *et al.*, 2009).

Dal momento che il motivo LLDL, identificato nella regione C-terminale del peptide p2 di Gag, non sembra essere importante nella gemmazione virale nel contesto del dominio tardivo *wild type*, è stato indagato se tale motivo potesse funzionare da *late domain* ausiliario nel contesto del Gag di FIV, mimando il motivo YPLTSL di HIV-1. Per verificare tale ipotesi, è stata quindi analizzata la capacità di AIP1/Alix di ripristinare la gemmazione di mutanti che presentano il motivo PSAP distrutto in ASAA in combinazione o meno della completa distruzione del motivo LLDL in AAAA e di un mutante in grado di esprimere la poliproteina Gag in assenza del dominio p2. Dalla co-trasfezione di tali costrutti assieme alla proteina cellulare AIP1/Alix, si è potuto dimostrare che AIP1/Alix è in grado di ripristinare il rilascio di questi mutanti dalle cellule trasfettate, in modo del tutto indipendente dal motivo LLDL. Inoltre, dai dati ottenuti è stato possibile affermare che nessuno degli elementi contenuti in p2 sembra essere responsabile dell'effetto di AIP1/Alix. È stato recentemente dimostrato che, nel caso di HIV-1, non solo il motivo YPLTSL funziona da sito di legame per AIP1, ma anche il

doppio motivo *zinc-finger* presente nel nucleocapside di Gag sembra essere coinvolto in tale interazione. Mediante comparazione bioinformatica tra i NC di HIV-1 e FIV è stato possibile affermare che vi è un elevato livello di omologia tra di essi, in particolare proprio a livello dei motivi *zinc-finger*. Attraverso l'utilizzo dei medesimi costrutti esprimenti la sola proteina Gag, ottenuta per mezzo dell'introduzione di un codone di stop a valle del gene *gag* è stato quindi possibile dimostrare come AIP1/Alix sia efficientemente incorporata nelle VLPs di FIV e di come nessun motivo presente in p2 Gag (né PSAP, né LLDL, ma neanche lo stesso p2) sia strettamente necessario per l'incorporazione. Tale evidenze sembrerebbero indicare come altre regioni di Gag cooperino con la regione p2 per la funzione di ripristino del rilascio dei mutanti di FIV da parte di AIP1/Alix e per la sua incorporazione nelle VLPs. I risultati indicano quindi che il motivo LLDL di FIV, a differenza del dominio tardivo YPLTSL di HIV-1, non rappresenta un *late domain* ausiliario.

Popov e colleghi hanno recentemente dimostrato che in HIV-1 le mutazioni a carico degli *zinc-fingers* del nucleocapside e, in particolare, la sostituzione combinata dell'ultimo residuo di cisteina di ciascuno dei due motivi leganti zinco, causano: i) la marcata riduzione del rilascio di particelle virali e l'accumulo intracellulare di forme intermedie di processamento di Gag conseguenti a mutazioni introdotte a livello dei *late domain*; ii) la perdita della capacità della proteina cellulare, qualora sovraespressa, di ripristinare i difetti di gemmazione dei mutanti dei domini tardivi; e iii) la mancata incorporazione di AIP1/Alix nei virioni, prodotti a partire da costrutti mutati a livello del *late domain* ausiliario di HIV-1. Poiché è stato appurato che tali mutazioni a carico del nucleocapside non hanno conseguenze sull'assemblaggio delle particelle del virus, i dati ottenuti depongono a favore di un ruolo per tale dominio di Gag nel rilascio di HIV-1, in virtù dell'interazione con la proteina AIP1/Alix (Popov *et al.*, 2008). Nel complesso quindi, le evidenze sperimentali ottenute per HIV-1 hanno permesso la formulazione di un modello nel quale il dominio tardivo P(T/S)AP coopera con altre regioni di Gag e, in particolare, con il dominio nucleocapsidico, al fine di promuovere l'efficiente gemmazione del virus dalla cellula ospite.

Alla luce dei risultati sopra riportati, si è indagato sulla possibilità che la regione del nucleocapside svolga un ruolo nel rilascio delle particelle virali di FIV. Si è quindi effettuata la sostituzione combinata delle cisteine in posizione 390 e 409 degli *zinc-fingers* con serina (C_{390,409}S), analogamente a quanto svolto per HIV-1 da Popov e colleghi (Popov *et al.*, 2008) così come la mutazione contestuale delle cisteine in posizione 377, 390, 396 e 409 (C_{377,390,396,409}S), al fine di ottenere la completa distruzione dei motivi *zinc-fingers*. Le sostituzioni della regione del

nucleocapside di FIV sono state combinate a specifiche mutazioni della regione p2 di Gag nel plasmide p Δ env1. Queste ultime, comprendono: la sostituzione del motivo aminoacidico LLDL con alanina (p Δ env1Mut21), per ottenere la distruzione di un putativo sito di interazione per AIP1/Alix; l'inattivazione funzionale del dominio tardivo PSAP, mediante sostituzione delle proline con alanina (p Δ env1Mut02); l'introduzione di un codone di stop al posto della prima prolina del *late domain*, per bloccare la traduzione della regione p2 di Gag (p Δ env1Mut Δ p2); e, infine, l'associazione di queste mutazioni con l'inattivazione della proteasi virale (p Δ env1Mut6, p Δ env1Mut21+6, p Δ env1Mut02+6, p Δ env1Mut Δ p2+6).

I risultati ottenuti con la distruzione delle cisteine in posizione 390 e 409 degli *zinc-fingers* con serina (C_{390,409}S), contrariamente a quanto osservato per HIV-1 (Popov *et al.*, 2008), non consentono di inferire un ruolo per le posizioni aminoacidiche 390 e 409 del nucleocapside di FIV né sulla gemmazione virale, né sulla costituzione di un putativo sito di legame per la proteina AIP1/Alix. E' stata riscontrata una riduzione del rilascio di particelle simil-virali e del ripristino della gemmazione, in condizioni di sovraespressione di AIP1/Alix, per il costrutto deleto della regione p2 di Gag in presenza delle mutazioni a carico delle cisteine 390 e 409 del nucleocapside. Tuttavia, AIP1/Alix viene efficientemente incorporata nei virioni prodotti a partire da tutti i costrutti mutanti testati, a riprova dell'integrità del suo putativo sito di interazione con specifici componenti virali. I risultati ottenuti con l'inattivazione simultanea delle cisteine nelle posizioni 377, 390, 396 e 409 (C_{377,390,396,409}S), conservati fra i vari retrovirus ed importanti per la funzionalità degli *zinc finger* (Dorfman *et al.*, 1993, Green and Berg, 1990), hanno dimostrato una diminuzione nel rilascio di VLPs, sia nel caso dei mutanti recanti il *late domain* di FIV *wild-type*, sia nei mutanti a livello della regione p2 di Gag. Inoltre, è stata osservata una riduzione della capacità di AIP1/Alix, qualora sovra espressa, di ripristinare la gemmazione dei medesimi mutanti in modo analogo a quanto ottenuto in seguito all'inattivazione dei residui cisteina in posizione 390 e 409. AIP1/Alix inoltre risulta essere incorporata nelle particelle simil-virali prodotte a partire da tutti i mutanti analizzati. In conclusione, le evidenze sperimentali ottenute indicano l'assenza di coinvolgimento dei residui di cisteina in posizione 377, 390, 396 e 409 dei motivi *zinc-fingers* del nucleocapside di FIV, sia nel ripristino della gemmazione di mutanti del *late domain*, in presenza di sovraespressione di AIP1/Alix, che nell'incorporazione della stessa proteina cellulare nelle particelle virali.

Recentemente, i lavori di Dussupt e colleghi hanno documentato a livello del nucleocapside di HIV-1 altri residui importanti coinvolti nell'interazione di

AIP1/Alix. Specificatamente, la mutazione dei residui basici della regione aminotermine del nucleocapside determina una marcata riduzione del rilascio dei virioni di HIV-1 e, nel contesto del *late domain* PSAP distrutto, l'incapacità AIP1/Alix, qualora overespressa, di ripristinare i difetti di gemmazione di tali mutanti (Dussupt *et al.*, 2009).

Alla luce di tali risultati, è stato quindi analizzato il contributo degli aminoacidi basici del nucleocapside di FIV nella gemmazione. In particolare, sono stati ottenuti costrutti basati su p Δ env1 recanti la sostituzione delle lisine con arginine e delle arginine con alanine, a livello della regione del nucleocapside che si estende tra le posizioni aminoacidiche 367 e 392, comprensiva del primo *zinc-finger* (K_{371,381,382}R, R_{388,391}A). Tali sostituzioni sono state combinate con le mutazioni della regione p2 di Gag sopra riportate. In modo analogo a quanto ottenuto con i mutanti a livello degli *zinc-finger*, è stata riscontrata una riduzione del rilascio di particelle simil-virali. In generale, la capacità di AIP1/Alix, qualora sovraespressa, di ripristinare la gemmazione dei medesimi mutanti risulta ridotta ma, come in precedenza, AIP1/Alix risulta essere incorporata nelle VLPs di tali mutanti. Nel complesso, questi risultati sembrano indicare l'assenza di un ruolo dei residui basici aminoterminali del nucleocapside di FIV nel ripristino della gemmazione di mutanti del *late domain* da parte di AIP1/Alix e nell'incorporazione della stessa proteina cellulare nelle particelle virali.

Le mutazioni introdotte a livello dei residui basici, in particolare la sostituzione delle lisine in arginine (K_{371,381,382}R), a differenza di quelle effettuate nel contesto di HIV-1 (Dussupt *et al.*, 2009), non portano ad un cambio sostanziale della regione in quanto entrambi gli aminoacidi appartengono allo stesso gruppo. Nonostante ciò, tale scelta è motivata dal fatto che è nostra intenzione valutare aspetti legati all'ubiquitinazione della poliproteina Gag in relazione sia alla regione nucleocapsidica sia alla funzionalità del dominio tardivo. Pertanto, resta da indagare la possibilità che la completa distruzione dei medesimi residui, mediante sostituzione con alanine, possa in qualche modo influire sulla capacità di AIP1/Alix del ripristino della gemmazione e nell'incorporazione della stessa nelle VLPs.

Nel complesso, i dati ottenuti permettono di chiarire alcune caratteristiche peculiari della poliproteina Gag di FIV e mettono in luce importanti differenze nelle interazioni molecolari che si instaurano tra componenti virali e fattori cellulari durante le fasi tardive del ciclo replicativo di FIV. Inoltre, i nostri risultati forniscono informazioni utili nel caso in cui FIV venga impiegato come modello per lo studio della patogenesi nell'infezione da HIV-1, per testare specifiche terapie anti-HIV-1 o per disegnare strategie volte all'ottimizzazione dei

processi di produzione della proteina Gag, che possono trovare importanti applicazioni biotecnologiche.

Molti determinanti cellulari possono favorire o contrastare diverse fasi del ciclo replicativo virale, sia quelle iniziali, tra cui l'ingresso, la spogliazione ed il trasporto del genoma al nucleo (Cooley *and* Lewin, 2003), sia quelle terminali, come l'assemblaggio delle particelle mature ed il loro rilascio (Morita *and* Sundquist, 2004). D'altro canto, i virus si sono adattati all'ambiente cellulare, sviluppando appropriate strategie al fine di ottimizzare la produzione di progenie virale. E' ormai chiaro che nel corso del tempo si sono evoluti meccanismi di restrizione della replicazione virale sia a livello di barriera di specie e/o di cellulo-specificità, sia a livello di immunità innata che possono agire nelle diverse fasi del ciclo biologico del virus. Di conseguenza, i virus hanno evoluto strategie adatte ad eludere tali blocchi grazie a specifiche interazioni tra proteine cellulari/virali strettamente dipendenti dal tipo di cellula e dalla specie a cui essi stessi si sono adattati. La specie specificità è evidente anche a livello di processi che sono ampiamente conservati tra i virus.

L'uomo e, in generale, i mammiferi sono sempre stati a contatto con patogeni virali di vario tipo durante l'evoluzione. Questo ha permesso lo sviluppo di specifiche proteine dell'ospite in grado di controllare la diffusione e, soprattutto, di prevenire le trasmissioni cross-specie di questi patogeni virali. Definiti come fattori di restrizione cellulare dell'ospite (*host restriction factor*), queste proteine sono componenti essenziali della risposta immunitaria innata in grado di interferire a diversi livelli del ciclo replicativo virale. Tali elementi possono essere costitutivamente espressi o indotti dall'interferone- α (IFN- α) in seguito all'infezione virale. Fino ad ora, sono state identificate tre maggiori classi di fattori antivirali attivi nei confronti dei retrovirus: APOBEC3G, che induce la ipermutazione del genoma retrovirale; TRIM5 α che colpisce il capsido retrovirale in ingresso; ed infine teterina (nota come BST2 o CD317), in grado di impedire il rilascio delle particelle retrovirali dalle cellule infettate (Malim *and* Emerman, 2008, Neil *and* Bieniasz, 2009, Sauter *et al.*, 2010). A loro volta, i virus hanno evoluto specifiche contromisure atte ad antagonizzare l'effetto di tali fattori di restrizione (Strebel *et al.*, 2009).

La proteina strutturale Gag dei retrovirus risulta fondamentale in molti processi del ciclo replicativo virale, tra cui assemblaggio virale, rilascio delle particelle ed ingresso del virus nella cellula bersaglio. Prendendo in considerazione le diverse classi di fattori antivirali, è possibile notare come questi ultimi colpiscano spesso la proteina Gag o le fasi del ciclo replicativo in cui è coinvolta (Luttge *and* Freed, 2009). In particolare, per quanto riguarda HIV-1, è stato dimostrato che: i)

APOBEC3G è incorporato nei virioni attraverso Gag (Bogen *and* Cullen, 2008) durante l'assemblaggio virale (Sheely *et al.*, 2002); ii) TRIM5 α colpisce il capsid virale nelle fasi post-*entry* (Towers *et al.*, 2000) e infine, iii) teterina inibisce il rilascio delle particelle virali dotate di *envelope*, mature e completamente formate (Neil *et al.*, 2008), *step* guidato dalla poliproteina Gag (Göttlinger *et al.*, 1991).

Nel contesto di FIV, solo di recente è stato investigato il ruolo dei fattori antivirali nel suo ospite, il gatto domestico. E' stato infatti dimostrato come la proteina felina APOBEC3H inibisca l'infettività dei virioni di FIV in assenza della proteina accessoria Vif (Zielonka *et al.*, 2010). Per quanto riguarda TRIM, nel gatto è stato documentato come siano presenti diversi geni codificanti tali classi di proteine ma la loro attività antivirale non è stata ancora provata. In generale, le cellule dei felini possiedono la proteina TRIM5 α , ma essa risulta tronca e non funzionale nei confronti di FIV (McEwan *et al.*, 2009). Per quanto riguarda teterina invece, in letteratura non vi sono studi che caratterizzano l'eventuale presenza di tale fattore antivirale nelle cellule feline.

Con l'obiettivo di analizzare gli aspetti molecolari alla base della specie-specificità degli eventi tardivi della replicazione di FIV ed in particolare allo scopo di identificare fattori cellulari potenzialmente in grado di limitarla, ci siamo focalizzati nella ricerca, nel genoma felino, nell'ortologo di teterina umana. Una volta identificata la teterina felina, ne è stata valutata la funzionalità e la capacità di bloccare il rilascio di FIV, iniziando così a caratterizzare gli eventuali determinanti virali in grado di antagonizzarne l'effetto. Parallelamente, abbiamo anche valutato il potenziale effetto di teterina felina nei confronti di HIV-1, virus non specie-specifico per il gatto.

E' stato dimostrato che, nell'uomo, la proteina BST2, rinominata teterina (hBST2), rappresenta il fattore cellulare innato in grado di bloccare il rilascio di HIV-1 e che questo virus utilizza la proteina accessoria Vpu per antagonizzarne l'azione antivirale (Neil *et al.*, 2008). Numerosi studi hanno in seguito dimostrato che BST2 è presente in numerose specie di mammiferi ed è in grado di interferire con il rilascio di numerosi virus dotati di *envelope*. Di conseguenza, i virus hanno a loro volta evoluto specifiche strategie in modo da interferirne con l'attività (Neil *et al.*, 2008, Jouvenet *et al.*, 2009, Kaletsky *et al.*, 2009, Mansuri *et al.*, 2009, Sakuma *et al.*, 2009, Radoshitzky *et al.*, 2010, Evans *et al.*, 2010).

E' stato dimostrata l'esistenza di numerosi ortologi di BST2 umana in diversi mammiferi quali il ratto, il topo, la scimmia e la pecora, e la capacità di tali proteine di essere funzionali nell'antagonizzare il rilascio di vari virus dotati di *envelope* (Arnaud *et al.*, 2009, Goffinet *et al.*, 2009, Kaletsky *et al.*, 2009, Jia *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2009). A partire da queste evidenze, abbiamo eseguito una

profonda analisi informatica all'interno del genoma del gatto domestico, completamente sequenziato e depositato in rete (Pontius *et al.*, 2007), con l'obiettivo di identificare un'ipotetico gene *bst2*. Sfruttando le piattaforme web di Ensemble Genome Browser (<http://www.ensembl.org>) ed NCBI Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.gov/mapview/genome/guide/cat>) è stato possibile identificare nel cromosoma A2 del gatto un ipotetico gene *bst2* felino con funzione non nota, rinominato cBST2 o teterina felina. E' stata quindi clonata la sequenza genica a partire da cellule di fibroblasti della porzione corticale del rene di gatto (CrFK), derivate dall'ospite fisiologico di FIV. Mediante comparazione bioinformatica con la forma umana di teterina, è stato possibile predire che BST2 felina condivide il 37% di omologia di sequenza aminoacidica con hBST2. Tramite specifici *tool* bioinformatici, è stato generato un ipotetico modello strutturale. In particolare, nonostante la bassa omologia di sequenza primaria, cBST2 ricapitola gli elementi strutturali tipici della proteina BST2, ovvero possiede una coda citoplasmatica (dall'aminoacido 1 al 30), un dominio transmembrana (dall'aminoacido 31 al 52), un dominio extracellulare (dall'aminoacido 53 al 160) ed, al carbossitermine, segnale di addizione per il gruppo glicosilfosfatidilinositolo o ancora GPI (posizione 161). cBST2 è dotata inoltre di 3 cisteine nel dominio extracellulare, presenti anche nel caso della forma umana, e di due siti di N-glicosilazione, uno conservato ed uno posto più a valle rispetto a quanto riscontrato in hBST2.

Al fine di caratterizzare in maggiore dettaglio cBST2 sono state generate due forme con un opportuno *tag* in posizione aminotermine e nella porzione extracellulare, in modo analogo a quanto riportato per la *tetherin* umana (Neil *et al.*, 2008, Perez-Caballero *et al.*, 2009). In particolare, per la forma con l'epitopo nell'*ectodomain*, tramite analisi bioinformatica e comparazione con hBST2 è stato possibile identificare un sito appropriato per l'inserimento del *tag*. Esso è stato posizionato infatti in una regione non strutturale tra la fine del dominio extracellulare e prima del segnale per l'addizione del glicosilfosfatidilinositolo (ancora GPI), in modo da non alterare le proprietà funzionali di BST2 (Perez-Caballero *et al.*, 2009). Inoltre, sono state generate la relative controparti prive del segnale di addizione del gruppo glicosilfosfatidilinositolo. Tali costrutti risultano particolarmente idonei per caratterizzare la funzionalità della forma *full length* di teterina, in quanto l'assenza di uno dei domini transmembrana è responsabile della perdita dell'attività antivirale di BST2. Infatti, la presenza di entrambe le regioni codificanti il dominio trasmembrana e dell'ancora GPI è un prerequisito essenziale per la corretta attività antivirale di BST2 (Neil *et al.*, 2008, Perez-Caballero *et al.*, 2009).

In parallelo, a partire dalla linea cellulare umana HeLa, esprime elevati livelli di BST2 endogena (Neil *et al.*, 2008), e dalla sequenza presente nel database di NCBI Entrez Gene, è stata clonata anche la forma umana di *tetherin* (hBST2), al fine di utilizzarla come controllo e ne è stata saggiata la funzionalità nei confronti di HIV-1.

Data la funzione conservata delle diverse teterine scoperte fino ad ora e data la significativa specie-specificità dei fattori antivirali (Evans *et al.*, 2010, Sauter *et al.*, 2009, Kirchhoff, 2010), è stata testata la capacità di cBST2 di bloccare il rilascio virale di un virus, HIV-1, che, non infettando in natura il gatto domestico, è ipotizzabile che non codifichi alcuna proteina antagonista a BST2 felina. In tale condizione è possibile quindi valutare se cBST2 agisca effettivamente da teterina. A tale scopo, è stato utilizzato HIV-1 nel contesto in cui Vpu è funzionale o meno e, come controllo, è stata impiegata la forma umana di teterina precedentemente ottenuta. E' stato quindi possibile dimostrare come la cBST2 identificata dal nostro gruppo di ricerca sia in grado di bloccare il rilascio di HIV-1 con efficienza, sia nel contesto Vpu+ che Vpu-, anche se questa risulta inferiore rispetto a quella riscontrabile con l'impiego di hBST2. Inoltre, in accordo con la specie-specificità, HIV-1 non presenta alcuna proteina, accessoria o strutturale, capace di interferire con l'effetto di cBST2. Infine, teterina felina nella forma *full length* risulta essere più efficiente rispetto alla corrispettiva forma in cui è assente l'ancora GPI, indicando come entrambi i domini transmembrana, siano necessari per mediare tale azione antivirale. In generale, è quindi possibile affermare che la forma di cBST2 da noi identificata possiede l'attività antivirale specifica di una proteina teterina, capace di bloccare il rilascio di particelle virali dotate di *envelope*, in particolare di quelle generate da HIV-1.

Successivamente, la teterina felina è stata caratterizzata negli aspetti considerati importanti per la sua azione antivirale: la localizzazione e la capacità di formare omodimeri (Neil *et al.*, 2008, Perez-Caballero *et al.*, 2009). E' stato ampiamente dimostrato come nelle diverse specie, la proteina BST2 si localizzi in modo predominante a livello della superficie della membrana plasmatica e nei compartimenti intracellulari corrispondenti agli endosomi tardivi (CD63+) (Kupzing *et al.*, 2003, Neil *et al.*, 2007, Neil *et al.*, 2008). Inoltre, è noto come l'azione antivirale di teterina si espliciti proprio sulla superficie cellulare, mediante la ritenzione dei virioni maturi e completamente formati a questo livello (Neil *et al.*, 2008). Attraverso studi di localizzazione mediante immunofluorescenza è stato possibile confermare che anche la cBST2, in modo analogo alla forma umana, si localizza a livello della superficie cellulare. Successivamente, abbiamo valutato la capacità di teterina felina di dimerizzare.

Studi presenti in letteratura hanno infatti documentato come tale proprietà sia critica per l'inibizione, da parte di hBST2, del rilascio delle particelle di HIV-1, ma risulti superflua per la sua l'espressione (Perez-Caballero *et al.*, 2009). La forma umana di BST2 è in grado di formare dimeri attraverso le tre cisteine (C53, C63, C91) presenti a livello del dominio extracellulare (Ohtomo *et al.*, 1999) e tali residui risultano essere conservati anche a livello della forma felina. Analizzando il comportamento di cBST2 in condizioni non riducenti, è stato possibile confermare che anche la forma felina è presente anche come omodimeri.

Successivamente, è stata valutata la capacità della teterina felina di antagonizzare il rilascio delle particelle virali di FIV. A tale scopo, è stato utilizzato un costrutto esprime il genoma *wild type* di FIV petaluma 34TF10 con le LTR al 5' e al 3' sostituite rispettivamente dal promotore del Cytomegalovirus (CMV) e dal segnale di poli-adenilazione dell'ormone della crescita bovino (BGH). La scelta è stata compiuta in quanto le cellule utilizzate generalmente per testare l'antagonismo virale sono di origine umana ed in tale contesto l'espressione delle LTR di FIV risulta limitata (Mustafa *et al.*, 2005). E' stato possibile constatare come l'efficienza di gemmazione di FIV non risulti essere influenzata dalla presenza di teterina felina. Tale risultato, in accordo con quanto accade per HIV-1 *wild type* in presenza di hBST2 (Neil *et al.*, 2008), indica che FIV possiede un antagonista virale in grado di antagonizzare l'effetto di teterina del suo ospite naturale. In parallelo, è stata dimostrata, come controllo, la capacità della BST2 umana di impedire il rilascio dei virioni di FIV indicando che questo virus, che in natura infetta i non primati, non possieda un gene virale in grado di contrastarne l'effetto. Tali risultati estendono i dati presenti in letteratura dimostrando come il rilascio di FIV, e non solo delle VLPs ottenute esprimendo i soli elementi strutturali Gag-Pol di FIV (Jouvenet *et al.*, 2009), venga bloccato dall'azione di hBST2. La dimostrazione che la gemmazione di FIV viene alterata dalla presenza di teterina umana enfatizza la specie-specificità di questi fattori antivirali che si sono appunto evoluti per impedire la *cross*-trasmissione dei patogeni virali.

A partire da queste considerazioni, è stato valutato l'eventuale contributo di proteine di FIV nell'interferire con l'azione di BST2 felina. La nostra attenzione s'è quindi focalizzata inizialmente sulla proteina strutturale Env, date le evidenze sperimentali riscontrate nel caso di SIV e HIV-2 per i quali è stato dimostrato che l'Envelope è in grado di delocalizzare BST2, permettendo così il rilascio virale (Bour *et al.*, 2009, Gupta *et al.*, 2009, LeTortorec and Neil, 2009). Per indagare tale aspetto è stato sviluppato il costrutto pΔLTREnvFR1 che presenta il prodotto del gene *env* reso non funzionale dall'introduzione di un *frameshift*. In questo modo è stato possibile dimostrare come cBST2 sia in grado di interferire nel

rilascio di FIV in assenza dell'Env. Successivamente, è stato valutato il contributo della proteina accessoria Orf-A di FIV in tale meccanismo, in quanto è stato documentato come essa sia coinvolta nelle fasi tardive del ciclo replicativo (Gemeniano *et al.*, 2003). A tale scopo, è stato ottenuto il costrutto p Δ LTROrfAStop che possiede il gene *orf-A* reso non funzionale in seguito ad introduzione di un codone di stop dopo l'ATG. A causa della ridotta capacità di rilascio di tale costrutto, non è stato possibile eseguire una dissezione approfondita sul contributo di Orf-A nei confronti di BST2 felina. Attualmente, in laboratorio, sono in corso gli esperimenti volti a delucidare il possibile apporto di Orf-A in tale processo. Nonostante ciò, è stata vagliata la possibilità che FIV, vista la semplicità del suo genoma se comparato a quello di HIV-1, contrattacchi l'effetto di teterina felina attraverso l'azione sinergica di Env e di Orf-A. A tal fine, è stato generato il mutante p Δ LTROrfAStopEnvFr1 che combina le mutazioni precedentemente descritte a livello dei geni *env* e *orf-A*. È stato quindi possibile provare come, in assenza di entrambe le proteine, teterina felina blocchi completamente il rilascio delle particelle di FIV. Tali risultati fanno ipotizzare come FIV abbia evoluto due proteine, Env ed Orf-A, al fine di antagonizzare l'attività antivirale della teterina del suo ospite naturale, il gatto domestico.

Questi risultati rappresentano un punto di partenza da un lato per caratterizzare in maggior dettaglio teterina felina e, dall'altro, per investigare i meccanismi con cui FIV ne limita l'azione. Inoltre, questi studi permettono di delucidare le complesse interazioni che si instaurano tra i patogeni virali ed il loro ospite e che rivestono un ruolo chiave nello sviluppo di FIV e del gatto domestico come modelli per la ricerca sull'AIDS.

9. ABBREVIAZIONI

A	alanina
AAA	<i>ATPase associated with various cellular activities</i>
AIDS	Sindrome dell'Immunodeficienza Acquisita
AIP-1	<i>ALG-2 interacting protein 1</i>
Alix	<i>ALG-2 interacting protein x</i>
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme, Catalytic polipeptide-like 3G</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	adenosina trifosfato
BGH	<i>Bovine Growth Hormone</i>
BSA	Albumina di Siero Bovino
BST2	<i>Bone stromal marrow antigen type 2</i>
C	Cisteina
CA	proteina capsidica
CAEV	Virus dell'Artrite e Encefalite Caprina
CHMP	<i>charged multivesicular body protein</i>
CrFK	<i>Crandell Feline Kidney</i>
DEPC	dietil-pirocarbonato
DLS	<i>Dimer Linkage Structure</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	acido desossiribonucleico
dNTP	desossiribonucleotide trifosfato
dTTP	desossitimidina trifosfato
dUMP	desossiuridina monofosfato
dUTP	desossiuridina trifosfato
D.O.	densità ottica
DU	deossiuridina trifosfatasi
E	acido glutammico
EIAV	Virus dell'Anemia Infettiva Equina
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
FBS	siero fetale bovino
FCS	siero fetale di vitello
FITC	Fluoresceina isotiocianato

FIV	Virus dell'Immunodeficienza Felina (<i>Feline Immunodeficiency Virus</i>)
GPI	Glicosilfosfatidilinositolo
HA	emoagglutinina
HCMV	Citomegalovirus Umano
HECT	<i>Homologous to E6AP C-terminus</i>
HIV-1	Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1
HIV-2	Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 2
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HRS	<i>Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>
HTLV-1	Virus della Leucemia Umana di tipo 1
ILV	<i>intraluminal vesicles</i>
IN	integrasi
INF-I	Interferone di tipo I
K	lisina
kb	chilo basi
kDa	chilo Dalton
KSHV	Herpesvirus del Sarcoma di Kaposi
L	leucina
L	<i>late</i>
LB	Luria Bertani
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
Lys	lisina
M	metionina
MA	proteina della matrice
MLV	Virus della Leucemia Murina
MVB	<i>Multivesicular Body</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology information</i>
Nedd4	<i>Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated-4</i>
NC	proteina nucleocapsidica
Nef	<i>Negative Factor</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P	prolina
pb	paia di basi
PBS	tampone fosfato
PCR	reazione a catena della polimerasi
PIC	<i>Preintegration complex</i>

PPT	<i>Polypurine Tract</i>
PPxY	Pro-Pro-x-Tyr
PRD	<i>Proline Rich Domain</i>
PSAP	Pro-Ser-Ala-Pro
PTAP	Pro-Thr-Ala-Pro
P(T/S)AP	Pro-(Thr/Ser)-Ala-Pro
PR	proteasi
p/v	peso su volume
R	arginina
rpm	rivoluzioni per minuto
RNA	acido ribonucleico
RNAsi	ribonucleasi
RRE	<i>Rev Responsive Element</i>
RSV	Virus del Sarcoma di Rous
RT	retrotrascrittasi inversa
S	serina
SDS	sodio dodecil-solfato
SIV	Virus dell'Immunodeficienza di Scimmia
SU	proteina di superficie
SV40	Virus Vacuolante della Scimmia 40
T	treonina
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N',N'-tetrametiletilenediammina
TGN	<i>Trans Golgi Network</i>
TM	proteina transmembrana
T _m	temperatura di fusione
TRIM5 α	<i>TRIPartite Motif Protein 5 alpha</i>
TSG101	<i>tumor susceptibility gene 101</i>
U	unità enzimatica
U3	sequenza unica in 3'
U5	sequenza unica in 5'
Ub	ubiquitina
UTP	uridina trifosfato
UV	luce ultravioletta
VIF	Fattore di infettività virale
VLPs	<i>Virus Like Particles</i>
VPS	<i>Vacuolar Protein Sorting</i>

Y	tirosina
YPxL	Tyr-Pro-x-Leu
v/v	volume su volume

10. BIBLIOGRAFIA

Amacker M, Hottiger M, Hubscher U. 1995. Feline Immunodeficiency Virus reverse transcriptase: expression, functional characterization, and reconstitution of the 66- and 51-kilodalton subunits. *J. Virol.* 69: 6273-6279.

Andrew AJ, Miyagi E, Kao S, Strebel K. 2009. The formation of cysteine-linked dimers of BST-2/tetherin is important for inhibition of HIV-1 virus release but not for sensitivity to Vpu. *Retrovirology.* 6: 80.

Arhel N and Kirchhoff F. 2010. Host proteins involved in HIV infection: New therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta.* 1802: 313-321.

Arnaud F, Black SG, Murphy L, Griffiths DJ, Neil SJ, Spencer TE, Palmarini M. 2010. Interplay between ovine bone marrow stromal cell antigen 2/tetherin and endogenous retroviruses. *J. Virol.* 84: 4415-4425.

Babst M, Katzmann D, Estepa-Sabal E, Meerloo T, Emr S. 2002. ESCRT-III. An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Dev. Cell.* 3: 271-282.

Babst M. 2005. A protein's final ESCRT. *Traffic.* 6: 2-9.

Bandinelli M, Pistello M, Lombardi S, Poli A, Garzelli C, Matteucci D, Ceccherini-Nelli L, Malvadi G, Zozzini F. 1995. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 8: 87-112.

Beatty JA, Willett BJ, Gault EA, Jarrett O. 1996. A longitudinal study of Feline Immunodeficiency Virus-specific cytotoxic T lymphocytes in experimentally infected cats, using antigen-specific induction. *J. Virol.* 70: 6199-6206.

Beebe AM, Dua N, Faith TG, Moore PF, Pedersen NC, Dandekar S. 1994. Primary stage of Feline Immunodeficiency Virus infection: viral dissemination and cellular targets. *J. Virol.* 68: 3080-3091.

Bailes E, Gao F, Bibollet-Ruche F, Courgnaud V, Peeters M, Marx PA, Hahn BH, Sharp PM. 2003. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science*. 300: 1713.

Bieniasz PD. 2006. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology*. 344: 55-63.

Bishop N and Woodman P. 2001. TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *J. Biol. Chem.* 76: 11735-11742.

Blasius AL, Giurisato E, Cella M, Schreiber RD, Shaw AS, Colonna M. 2006. Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J. Immunol.* 177: 3260-3265.

Bogerd HP and Cullen BR. 2008. Single-stranded RNA facilitates nucleocapsid: APOBEC3G complex formation. *RNA*. 14: 1228-1236.

Bour S, Schubert U, Peden K, Strebel K. 1996. The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? *J. Virol.* 70: 820-829.

Calistri A, Del Vecchio C, Salata C, Celestino M, Celegato M, Göttlinger H, Palù G, Parolin C. 2009a. Role of Feline Immunodeficiency Virus L-Domain in the presence or absence of Gag processing: involvement of ubiquitin and Nedd4-2s ligase in viral egress. *J. Cell. Physiol.* 218: 175- 182.

Calistri A, Salata C, Parolin C, Palù G. 2009b. Role of multivesicular bodies and their components in the egress of enveloped RNA viruses. *Rev. Med. Virol.* 19: 31-45.

Carlton JG, Agromyror M, Martin-Serrano J. 2008. Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 10541-10546.

Casartelli N, Sourisseau M, Feldmann J, Guivel-Benhassine F, Mallet A, Marcelin AG, Guatelli J, Schwartz O. 2010. Tetherin restricts productive HIV-1 cell-to-cell transmission. *PLoS Pathog.* 6: e1000955.

Chatterji U, de Parseval A, Elder JH. 2003. Feline Immunodeficiency Virus OrfA is distinct from other lentivirus transactivators. *J. Virol.* 76: 9624-9634.

Chung HY, Morita E, von Schwedler U, Müller B, Kräusslich HG, Sundquist WI. 2008. NEDD4L Overexpression rescues release and infectivity of HIV-1 constructs lacking PTAP and YPYL late domains. *J. Virol.* 82: 4884-4897.

Coats KS. 2005. The feline immunodeficiency virus-infected cat: a model for lentivirus-induced placental immunopathology and reproductive failure (mini-review). *Am. J. Reprod. Immunol.* 54: 169-185.

Cooley LA, Lewin SR. 2003. HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *J. Clin. Virol.* 26: 121-132.

Courchamp F and Pontier D. 1994. Feline immunodeficiency virus: an epidemiological review. *C. R. Acad. Sci. III.* 317: 1123-1134.

Cullen BR. 2003. Nuclear mRNA export: insights from virology. *Trends Biochem. Sci.* 28: 419-424.

Dean GA, Himathongkham S, Sparger EE. 1999. Differential cell tropism of feline immunodeficiency virus molecular clones in vivo. *J. Virol.* 73: 2596-2603.

de Parseval A, Chatterji U, Sun P, Elder JH. 2004. Feline immunodeficiency virus targets activated CD4⁺T cells by using CD134 as a binding receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 13044-13049.

de Parseval A and Elder JH. 1999. Demonstration that orf2 encodes the feline immunodeficiency virus transactivating (Tat) protein and characterization of a unique gene product with partial rev activity. *J. Virol.* 73: 608-617.

Darlix JL, Lapadat-Tapolsky M, De Rocquigny H, Roques BP. 1995. First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses. *J. Mol. Biol.* 254: 523-537.

Dorfman T, Luban J, Goff SP, Haseltine WA, Göttlinger HG. 1993. Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J. Virol.* 67: 6159-6169.

Dubé M, Roy BB, Guiot-Guillain P, Mercier J, Binette J, Leung G, Cohen EA. 2009. Suppression of Tetherin-restricting activity 1 on HIV-1 particle release correlates with localization of Vpu in the trans-Golgi network. *J. Virol.* 83: 4574-4579.

Dussupt V, Javid MP, Abou-Jaoudé G, Jadwin JA, de La Cruz J, Nagashima K, Bouamr F. 2009. The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPXnL late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *Plos Pathog.* 5: e1000339.

Egberink HF, Ederveen J, Montelaro RC, Pedersen NC, Horzinek MC, Koolen MJM. 1990. Intracellular proteins of Feline Immunodeficiency Virus and their antigenic relationship with Equine Infectious Anemia Virus proteins. *J. Gen. Virol.* 71: 739-743.

Elder JH, Schnolzer M, Hasselkus-Light CS, Henson M, Lerner DA, Phillips TR. 1993. Identification of proteolytic processing sites within the Gag and Pol polyproteins of Feline Immunodeficiency Virus. *J. Virol.* 67: 1869-1876.

Elder JH, Sundstrom M, de Rozieres S, de Parseval A, Grant CH, Lin YC. 2008. Molecular mechanisms of FIV infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123: 3-13.

Evans DT, Serra-Moreno R, Singh RK, Guatelli JC. 2010. BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses. *Trends Microbiol.* 18: 388-396.

Fisher RD, Chung HY, Zhai Q, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP. 2007. Structural and Biochemical Studies of ALIX/AIP1 and Its Role in Retrovirus Budding. *Cell.* 128: 851-851.

Fitzpatrick K, Skasko M, Deerinck TJ, Crum J, Ellisman MH, Guatelli J. 2010. Direct restriction of virus release and incorporation of the interferon-induced protein BST-2 into HIV-1 particles. *PLoS Pathog.* 6: e1000701.

Fujii K, Hurley JH, Freed EO. 2007. Beyond Tsg101: the role of Alix in “ESCRTing” HIV-1. *Nature.* 5: 912-916.

Gaddis NC, Sheehy AM, Ahmad KM, Swanson CM, Bishop KN, Beer BE, Marx PA, Gao F, Bibollet-Ruche F, Hahn BH, Malim MH. 2004. Further investigation of simian immunodeficiency virus Vif function in human cells. *J. Virol.* 78: 12041-12046.

Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH. 2001. TSG101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell.* 107: 55-65.

Gemeniano MC, Sawai ET, Leutenegger CM, Sparger EE. 2003. Feline Immunodeficiency Virus ORF-A is required for virus particle formation and virus infectivity. *J. Virol.* 77: 8819-8830.

Gemeniano MC, Sawai ET, Sparger EE. 2004. Feline Immunodeficiency Virus Orf-A localizes to the nucleus and induces cell cycle arrest. *Virology.* 325: 167-174.

Goffinet C, Allespach I, Homann S, Tervo HM, Habermann A, Rupp D, Oberbremer L, Kern C, Tibroni N, Welsch S, Krijnse-Locker J, Banting G, Kräusslich HG, Fackler OT, Keppler OT. 2009. HIV-1 antagonism of CD317 is species specific and involves Vpu-mediated proteasomal degradation of the restriction factor. *Cell Host Microbe.* 5: 285-297.

Goto Y, Nishimura Y, Mizuno T, Endo Y, Baba K, Momoi Y. 2000. Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Am. J. Vet. Res.* 61: 1609-1613.

Göttlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on Human Immunodeficiency Virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 88: 3195-3199.

Göttlinger HG, Dorfman T, Cohen EA, Haseltine WA. 1993. Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 15: 7381-7385.

Green LM and Berg JM. 1990. Retroviral nucleocapsid protein-metal ion interactions: folding and sequence variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 6403-6407.

Gupta RK, Mlcochova P, Pelchen-Matthews A, Petit SJ, Mattiuzzo G, Pillay D, Takeuchi Y, Marsh M, Towers GJ. 2009. Simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein counteracts tetherin/BST-2/CD317 by intracellular sequestration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 20889-20894.

Gupta RK and Towers GJ. 2009. A tail of Tetherin: how pandemic HIV-1 conquered the world. *Cell Host Microbe.* 6: 393-395.

Habermann A, Krijnse-Locker J, Oberwinkler H, Eckhardt M, Homann S, Andrew A, Strebel K, Kräusslich HG. 2010. CD317/tetherin is enriched in the HIV-1 envelope and downregulated from the plasma membrane upon virus infection. *J. Virol.* 84: 4646-4658.

Haglund K and Dikic I. 2005. Ubiquitylation and cell signalling. *Embo J.* 24: 3353-3359.

Harila K, Prior I, Sjoberg M, Salminen A, Hinkula J, Suomalainen M. 2006. Vpu and Tsg101 regulate intracellular targeting of the human immunodeficiency virus type 1 core protein precursor Pr55gag. *J. Virol.* 80: 3765-3772.

Harris RS and Liddament MT. 2004. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol.* 4: 868-877.

Harty RN, Brown ME, McGettigan JP, Wang G, Jayakar HR, Huibregtse JM, Whitt MA, Schnell MJ. 2001. Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction. *J. Virol.* 75: 10623-10629.

Hauser H, Lopez LA, Yang SJ, Oldenburg JE, Exline CM, Guatelli JC, Cannon PM. 2010. HIV-1 Vpu and HIV-2 Env counteract BST-2/tetherin by sequestration in a perinuclear compartment. *Retrovirology.* 7: 51.

Hinz A, Miguet N, Natrajan G, Usami Y, Yamanaka H, Renesto P, Hartlieb B, McCarthy AA, Simorre JP, Göttlinger H, Weissenhorn W. 2010. Structural basis of HIV-1 tethering to membranes by the BST-2/tetherin ectodomain. *Cell Host Microbe*. 7: 314-323.

Hohdatsu T, Okada S, Motokawa K, Aizawa C, Yamamoto JK, Koyama H. 1997. Effect of dual-subtype vaccine against feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Microbiol*. 58: 155-165.

Hong Y, Fink E, Hu QY, Kiosses WB, Elder JH. 2010. OrfA downregulates Feline immunodeficiency virus primary receptor CD134 on the host cell surface and is important in viral infection. *J. Virol*. 84: 7225-7232.

Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*. 77: 61-68.

Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO. 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol*. 69: 6810-6818.

Hui EKW, Barman S, Yang TY, Nayak DP. 2003. Basic Residues of the Helix Six Domain of Influenza Virus M1 Involved in Nuclear Translocation of M1 Can Be Replaced by PTAP and YPDL Late Assembly Domain Motifs. *J. Virol*. 77: 7078-7092.

Ikeda Y, Inoshima Y, Kawaguchi Y, Maeda K, Kohmoto M, Kai C. 1998. Protein-binding properties of the putative AP-1 and ATF sequences in the Feline Immunodeficiency Virus long terminal repeat. *J. Gen. Virol*. 79: 95-99.

Ishikawa J, Kaisho T, Tomizawa H, Lee BO, Kobune Y, Inazawa J, Oritani K, Itoh M, Ochi T, Ishihara K. 1995. Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that may be involved in pre-B-cell growth. *Genomics*. 26: 527-534.

Jia B, Serra-Moreno R, Neidermyer W, Rahmberg A, Mackey J, Fofana IB, Johnson WE, Westmoreland S, Evans DT. 2009. Species-specific activity of SIV Nef and HIV-1 Vpu in overcoming restriction by tetherin/BST2. *PLoS Pathog.* 5: e1000429.

Jouvenet N, Neil SJ, Zhadina M, Zang T, Kratovac Z, Lee Y, McNatt M, Hatzioannou T, Bieniasz PD. 2009. Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *J. Virol.* 83: 1837-1844.

Kaletsky RL, Francica JR, Agrawal-Gamse C, Bates P. 2009. Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 2886-2891.

Kang, Y, Xie L, Tran DT, Stein CS, Hickey M, Davidson BL, McCray Jr PB. 2005. Persistent expression of factor VIII in vivo following nonprimate lentiviral gene transfer. *Blood.* 106: 1552–1558.

Kirchhoff F. 2010. Immune evasion and counteraction of restriction factors by HIV-1 and other primate lentiviruses. *Cell Host Microbe.* 8: 55-67.

Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA, Orenstein JM. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* 64: 621-629.

Kratovac Z, Virgen CA, Bibollet-Ruche F, Hahn BH, Bieniasz PD, Hatzioannou T. 2008. Primate lentivirus capsid sensitivity to TRIM5 proteins. *J. Virol.* 82: 6772-6777.

Kupzig S, Korolchuck V, Rollason R, Sugden A, Wilde A, Banting G. 2003. Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic.* 4: 694-709.

Laco GS, Schalk-Hihi C, Lubkowski J, Morris G, Zdanov A, Olson A, Elder JH, Wlodawer A, Gustchina A. 1997. Crystal structure of the inactive D30N mutant of the Feline Immunodeficiency Virus protease complexed with a substrate and an inhibitor. *Biochemistry.* 36: 10696-10708.

LaRue R, Lengyel J, Jonsson SR, Andresdottir V, Harris RS. 2010. Lentiviral Vif degrades the APOBEC3Z3/APOBEC3H protein of its mammalian host and is capable of cross-species activity. *J. Virol.* 84: 8193-8201.

Le Tortorec A and Neil SJ. 2009. Antagonism to and intracellular sequestration of human tetherin by the human immunodeficiency virus type 2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 83: 11966-11978.

Lin YC, Beck Z, Morris GM, Olson AJ, Elder JH. 2003. Structural basis for distinctions between substrate and inhibitor specificities for Feline Immunodeficiency Virus and Human Immunodeficiency Virus proteases. *J. Virol.* 77: 6589-600.

Liu J, Chen K, Wang JH, Zhang C. 2010. Molecular evolution of the primate antiviral restriction factor tetherin. *PLoS One.* 5: e11904.

Luttge BG, Shehu-Xhilaga M, Demirov DG, Adamson CS, Soheilian F, Nagashima K, Stephen AG, Fisher RJ, Freed EO. 2008. Molecular Characterization of Feline Immunodeficiency Virus Budding. *J. Virol.* 82: 2106-2119.

Luttge BG, Freed EO. 2010. FIV Gag: Virus assembly and host-cell interactions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134: 3-13.

Malim MH and Emerman M. 2008. HIV-1 accessory proteins-ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe.* 3: 388-398.

Manrique ML, Celma CCP, Gonzàlez SA, Affranchino JL. 2001. Mutational analysis of the feline immunodeficiency virus matrix protein. *Virus res.* 76: 103-113.

Manrique ML, Gonzalez SA, Affranchino JL. 2004. Functional relationship between the matrix proteins of feline and simian immunodeficiency viruses. *Virology.* 329: 157-167.

Mansouri M, Viswanathan K, Douglas JL, Hines J, Gustin J, Moses AV, Früh K. 2009. Molecular mechanism of BST2/tetherin downregulation by K5/MIR2 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 83: 9672-9681.

Mangeat B, Gers-Huber G, Lehmann M, Zufferey M, Luban J, Piguet V. 2009. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. *PLoS Pathog.* 5: e1000574.

Margottin F, Bour SP, Durand H, Selig L, Benichou S, Richard V, Thomas D, Stebel K, Benarous R. 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell.* 1: 565-574.

Martin-Serrano J, Perez-Caballero D, Bieniasz PD. 2004. Context dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J. Virol.* 78: 5554-5563.

Masuyama N, Kuronita T, Tanaka R, Muto T, Hirota Y, Takigawa A, Fujita H, Aso Y, Amano J, Tanaka Y. 2009. HM1.24 is internalized from lipid rafts by clathrin-mediated endocytosis through interaction with alpha-adaptin. *J. Biol. Chem.* 284: 15927-15941.

McEwan WA, Schaller T, Ylinen LM, Hosie MJ, Towers GJ, Willett BJ. 2009. Truncation of TRIM5 in the Feliformia explains the absence of retroviral restriction in cells of the domestic cat. *J. Virol.* 83: 8270-8275.

McNatt MW, Zang T, Hatzioannou T, Bartlett M, Fofana IB, Johnson WE, Neil SJ, Bieniasz PD. 2009. Species-specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrana domain variants. *PLoS Pathog.* 5: e1000300.

Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, Gabuzda D. 2004. Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* 279: 7792-7798.

Mitchell RS, Katsura C, Skasko MA, Fitzpatrick K, Lau D, Ruiz A, Stephens EB, Margottin-Goguet F, Benarous R, Guatelli JC. 2009. Vpu antagonizes BST-2-mediated restriction of HIV-1 release via beta-TrCP and endo-lysosomal trafficking. *PLoS Pathog.* 5: e1000450.

Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Ohba K, Yamaoka S, Fukuda M, Guatelli J, Yamamoto N. 2009. BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. *PLoS Pathog.* 5: e1000700.

Miyazawa T, Furuya T, Itagaki SI, Tohya Y., Nakano N, Takahaschi E, Mikami T. 1989. Preliminary comparison of the biological proprieties of two strains of Feline Immunodeficiency Virus (FIV) isolated in Japan with FIV Petaluma strain isolated in the USA. *Arch. Virol.* 108: 59-68.

Mooij P and Heeney JL. 2001. Rational development of prophylactic HIV vaccines based on structural and regulatory proteins. *Vaccine.* 20: 304-321.

Montagnier L. 2010. 25 years after HIV discovery: Prospects for cure and vaccine. *Virology.* 397: 248-254.

Morikawa S and Bishop DHL. 1992. Identification and analysis of the *gag-pol* ribosomal frameshift site of feline immunodeficiency virus. *Virology.* 186: 389-397.

Morita E and Sundquist WI. 2004. Retrovirus Budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 395-425.

Mukhopadhyay D and Riezman H. 2007. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signalling. *Science.* 315: 201-205.

Münk C, Beck T, Zielonka J, Hotz-Wagenblatt A, Chareza S, Battenberg M, Thielebein T, Cichutek K, Bravo I, O'Brien SJ, Löchelt M, Yuhki N. 2008. Functions, structure, and readthrough alternative splicing of feline APOBEC3 genes. *Genome Biol.* 9: R48.1-20.

Murphy WJ, Davis B, David VA, Agarwala R, Schaffer AA, J.vPearks Wilkerson V, Neelam B, O'Brien J, Menotti-Raymond S, Menotti-Raymond M. 2007. A 1.5-Mb-resolution radiation hybrid map of the cat genome and comparative analysis with the canine and human genomes. *Genomics.* 89: 189-196.

Musey L, Hughes J, Schacker T, Shea T, Corey L, McElrath MJ. 1997. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. *New Engl. J. Med.* 337: 1267-1274.

Mustafa F, Jayanth P, Phillip PS, Ghazawi A, Schmidt RD, Lew KA, Rizvi TA. 2005. Relative activity of the feline immunodeficiency virus promoter in feline and primate cell lines. *Microbes Infect.* 7: 233-239.

Neil SJ, Eastman SW, Jouvenet N, Bieniasz PD. 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog.* 2: e39.

Neil SJ, Sandrin V, Sundquist WI, Bieniasz PD. 2007. An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host Microbe.* 3: 193-203.

Neil SJ, Zang T, Bieniasz PD. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature.* 451: 425-430.

Neil S and Bieniasz P. 2009. Human immunodeficiency virus, restriction factors, and interferon. *J. Interferon Cytokine Res.* 29: 569-580.

Odorizzi G. 2006. The multiple personalities of Alix. *J. Cell. Sci.* 119: 3025-3032.

Olmsted RA, Hirsh VM, Purcell RH, Johnson PR. 1989. Nucleotide sequence analysis of feline immunodeficiency virus: genome organization and relationship to other lentivirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 8088-8092.

Ohtomo T, Sugamata Y, Ozaki Y, Ono K, Yoshimura Y, Kawai S, Koishihara Y, Ozaki S, Kosaka M, Hirano T, Tsuchiya M. 1999. Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiplenmyeloma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258: 583-591.

Parent LJ, Bennett RP, Craven RC, Nelle TD, Krishna NK, Bowzard JB, Wilson CB, Puffer BA, Montelaro RC, Wills JW. 1995. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J. Virol.* 69: 5455-5460.

Pardieu C, Vigan R, Wilson SJ, Calvi A, Zang T, Bieniasz P, Kellam P, Towers GJ, Neil SJ. 2010. The RING-CH ligase K5 antagonizes restriction of KSHV and HIV-1 particle release by mediating ubiquitin-dependent endosomal degradation of tetherin. *PLoS Pathog.* 6: e1000843.

Patnaik A, Chau V, Wills JW. 2000. Ubiquitin is a part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13069-13074.

Pedersen NC, Ho EW, Brown ML, Yamamoto JK. 1987. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cat with a immunodeficiency-like syndrome. *Science.* 235: 790-793.

Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, Bieniasz PD. 2009. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells. *Cell.* 139: 499-511.

Petitt SC, Sheng N, Tritch R, Erickson-Viitanen S, Swanstrom R. 1998. The regulation of sequential processing of HIV-1 Gag by the viral protease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 436: 15-25.

Phillips TR, Lamont C, Konings DA, Shacklett BL, Hamson CA, Luciw PA, Elder JH. 1992. Identification of the Rev transactivation and Rev-responsive elements of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 66: 5464-5471.

Piper RC and Katzmann DJ. 2007. Biogenesis and function of Multivesicular Bodies. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23: 519-547.

Pistello M. 2008. Should accessory proteins be structural components of lentiviral vaccines? Lessons learned from the accessory ORF-A protein of FIV. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123: 144-149.

Poli G, Orenstein JM, Kinter A, Folks TM, Fauci AS. 1989. Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. *Science.* 244: 575-577.

Pontius JU, Mullikin JC, Smith DR; Agencourt Sequencing Team, Lindblad-Toh K, Gnerre S, Clamp M, Chang J, Stephens R, Neelam B, Volfovsky N, Schäffer AA, Agarwala R, Narfström K, Murphy WJ, Giger U, Roca AL,

Antunes A, Menotti-Raymond M, Yuhki N, Pecon-Slattery J, Johnson WE, Bourque G, Tesler G; NISC Comparative Sequencing Program, O'Brien SJ. 2007. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res.* 11: 1675-1689.

Popov S, Popova E, Inoue M, Göttlinger HG. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the nucleocapsid. *J. Virol.* 82: 1389-1398.

Popova E, Popov S, Göttlinger HG. 2010. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid-p1 Confers ESCRT Pathway Dependence. *J. Virol.* 84: 6590-6597.

Pu R, Tellier MC, Yamamoto JK. 1997. Mechanism(s) of FIV vaccine protection. *Leukemia.* 11: 98-101.

Puffer BA, Parent LJ, Wills JW, Montelaro RC. 1997. Equine Infectious Anemia Virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J. Virol.* 71: 6541-6546.

Radoshitzky SR, Dong L, Chi X, Clester JC, Retterer C, Spurgers K, Kuhn JH, Sandwick S, Ruthel G, Kota K, Boltz D, Warren T, Kranzusch PJ, Whelan SP, Bavari S. 2010. Infectious assa virus, but not filoviruses, is restricted by BST-2/tetherin. *J. Virol.* 84: 10569-10580.

Raiborg C, Bremnes B, Mehlum A, Gillooly DJ, D'Arrigo A, Stang E, Stenmark H. 2001. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J. Cell. Sci.* 114: 2255-2263.

Raiborg C and Stenmark H. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 458: 445-452.

Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, Schu P, Banting G. 2007. Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif. *J. Cell. Sci.* 21: 3850-3858.

Rollason R, Korolchuk V, Hamilton C, Jepson M, Banting G. 2009. A CD317/tetherin-RICH2 complex plays a critical role in the organization of the subapical actin cytoskeleton in polarized epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 184: 721-736.

Rong L, Zhang J, Lu J, Pan Q, Lorgeoux RP. 2009. The transmembrane domain of BST-2 determines its sensitivity to down-modulation by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu. *J. Virol.* 83: 7536-546.

Saenz DT and Poeschla EM. 2004. FIV: from lentivirus to lentivector. *J. Gene. Med.* 6: S95-S104.

Sakuma T, Noda T, Urata S, Kawaoka Y, Yasuda J. 2009. Inhibition of Lassa and Marburg virus production by tetherin. *J. Virol.* 83: 2382-2385.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 5463-5467.

Sauter D, Schindler M, Specht A, Landford WN, Münch J, Kim KA, Votteler J, Schubert U, Bibollet-Ruche F, Keele BF, Takehisa J, Ogando Y, Ochsenbauer C, Kappes JC, Ayoub A, Peeters M, Learn GH, Shaw G, Sharp PM, Bieniasz P, Hahn BH, Hatzioannou T, Kirchhoff F. 2009. Tetherin-driven adaptation of Vpu and Nef function and the evolution of pandemic and nonpandemic HIV-1 strains. *Cell Host Microbe.* 6: 409-421.

Sauter D, Specht A, Kirchhoff F. 2010. Tetherin: holding on and letting go. *Cell.* 141:392-398.

Schubert U, Ott DE, Chertova EN, Welker R, Princiotta MF, Bennink JR, Kräusslich HG, Yewdell JW. 2000. Proteasome inhibition interferes with Gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13057-13062.

Schubert HL, Zhai Q, Sandrin V, Eckert DM, Garcia-Maya M, Saul L, Sundquist WI, Steiner RA, Hill CP. 2010. Structural and functional studies on the extracellular domain of BST2/tetherin in reduced and oxidized conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 17951-17956.

Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, Malim MH. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* 418: 646-650.

Shimojima M, Miyazawa T, Ikeda Y, McMonagle EL, Haining H, Akashi H, Takeuchi Y, Hosie MJ, Willett BJ. 2004. Use of CD134 as a primary receptor by the Feline Immunodeficiency Virus. *Science*. 303: 1192-1195.

Song W, Collisson EW, Billingsley PM, Brown WC. 1992. Induction of Feline Immunodeficiency Virus-specific cytolytic T-cell responses from experimentally infected cats. *J. Virol.* 66: 5409-5217.

Sparger EE, Shacklett BL, Renshaw-Gegg L, Barry PA, Pedersen NC, Elder JH, Luciw PA. 1992. Regulation of gene expression directed by the long terminal repeat of the Feline Immunodeficiency Virus. *Virology*. 187: 165-177.

Steinman R, Dombrowski J, O'Connor T, Montelaro RC, Tonelli Q, Lawrence K, Seymour C, Goodness J, Pedersen NC, Andersen PR. 1990. Biochemical and immunological characterization of the major structural proteins of Feline Immunodeficiency Virus. *J. Gen. Virol.* 71: 701-706.

Strack B, Calistri A, Accola MA, Palu G, Gottlinger HG. 2000. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13063-13068.

Strack B, Calistri A, Göttinger HG. 2002. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J. Virol.* 76: 5472-5479.

Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG. 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*. 114: 689-699.

Strebel K, Luban J, Jeang KT. 2009. Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication. *BMC Med.* 7: 48.

Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*. 427: 848-853.

Stremlau M, Song B, Javanbakht H, Perron M, Sodroski J. 2006. Cyclophilin A: an auxiliary but not necessary cofactor for TRIM5 α restriction of HIV-1. *Virology*. 351: 112-120.

Sundstrom M, Chatterji U, Schaffer L, de Rozières S, Elder JH. 2008. Feline immunodeficiency virus OrfA alters gene expression of splicing factors and proteasome ubiquitination proteins. *Virology*. 371: 394-404.

Swanstrom R and Willis J. 1997. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In: Coffin J, Hughes S *et al.* (Eds), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Publisher, NY, 263-334.

Talbott RL, Sparger EE, Lovelace KM, Fitch WM, Pedersen NC, Luciw PA. 1989. Nucleotide sequence and genomic organization of Feline Immunodeficiency Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56: 5743-5747.

Takebe Y, Seiki M, Fujisawa J, Hoy P, Yokotta K, Arai K, Yoshida M, Arai N. 1988. 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 Leukemia Virus type-1 long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 8: 466-472.

Tang H, Kuhen KL, Wong-Staal F. 1999. Lentiviruses replication and regulation. *Annu. Rev. Genet.* 33: 133-170

Thomas JA and Gorelick RJ. 2008. Nucleocapsid protein function in early infection processes. *Virus Res.* 134: 39-63.

Tokarev A, Skasko M, Fitzpatrick K, Guatelli J. 2009. Antiviral activity of the interferon-induced cellular protein BST-2/tetherin. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 25:1197-210.

Tomonaga K and Mikami T. 1996. Molecular biology of the Feline Immunodeficiency Virus auxiliary genes. *J. Gen. Virol.* 77: 1611-1621.

Towers G, Bock M, Martin S, Takeuchi Y, Stoye JP, Danos O. 2000. A conserved mechanism of retrovirus restriction in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 12295-12299.

Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME, Johnson W, VandeWoude S, Vazquez-Salat N, Brown M, Frank L, Woodroffe R, Winterbach C, Winterbach H, Hemson G, Bush M, Alexander KA, Revilla E, O'Brien SJ. 2005. Seroprevalence and genomic divergence of circulating strains of feline immunodeficiency virus among Felidae and Hyaenidae species. *J. Virol.* 79:8282-8294.

Udenfriend S and Kodukula K. 1995. Prediction of omega site in nascent precursor of glycosylphosphatidylinositol protein. *Meth. Enzymol.* 250: 571–582.

Usami Y, Popov S, Göttlinger HG. 2007. Potent Rescue of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Late Domain Mutants by ALIX/AIP1 Depends on Its CHMP4 Binding Site. *J. Virol.* 81: 6614-6622.

Usami Y, Popov S, Popova E, Göttlinger, H. G. 2008. Efficient and specific rescue of human immunodeficiency virus type 1 budding defects by a Nedd4-like ubiquitin ligase. *J. Virol.* 82: 4898-4907.

Van Damme N, Goff D, Katsura C, Jorgenson RL, Mitchell R, Johnson MC, Stephens EB, Guatelli J. 2008. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe.* 3: 245-252.

Van Heuverswyn F and Peeters M. 2007. The origins of HIV and implications for the global epidemic. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 9: 338-346.

Varmous HE and Brown P. 1989. Retrovirus. In: Berg D and Howe M.M. (Eds), Mobile DNA pp. 53-108. American Society For Microbiology Washington D.C.

Varthakavi V, Smith RM, Bour SP, Strebel K, Spearman P. 2003. Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 15154-15159.

Vink C, van der Linden KH, Plasterk RH. 1994. Activities of the Feline Immunodeficiency Virus integrase protein produced in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 68: 1468-1474.

Waters AK, De Parseval AP, Lerner DL, Neil JC, Thompson FJ, Elder HH. 1996. Influence of ORF2 on host cell tropism of Feline Immunodeficiency Virus. *Virology*. 215: 10-16.

Willett BJ, Hosie MJ, Neil JC, Turner JD, Hoxie JA. 1997a. Common mechanism of infection by lentiviruses. *Nature*. 385: 587.

Willett BJ, Picard L, Hosie MJ, Turner JD, Adema K, Clapham PR. 1997b. Shared usage of the chemokine receptor CXCR4 by the feline and human immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 71: 6407–6415.

Willett BJ, Cannon CA, Hosie MJ. 2003. Expression of CXCR4 on feline peripheral blood mononuclear cells: effect of Feline Immunodeficiency Virus infection. *J. Virol.* 77: 709-712.

Willett BJ and Hosie MJ. 2008. Chemokine receptors and co-stimulatory molecules: unravelling feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123: 56-64.

Yang H, Wang J, Jia X, McNatt MW, Zang T, Pan B, Meng W, Wang HW, Bieniasz PD, Xiong Y. 2010. Structural insight into the mechanisms of enveloped virus tethering by tetherin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 18428-18432.

Zhang J and Liang C. 2010. BST-2 diminishes HIV-1 infectivity. *J. Virol.* 23: 12336-12343.

Zhang F, Wilson SJ, Landford WC, Virgen B, Gregory D, Johnson MC, Munch J, Kirchhoff F, Bieniasz PD, Hatzioannou T. 2009. Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists. *Cell Host Microbe*. 6: 54-67.

Zielonka J, Marino D, Hofmann H, Yuhki N, Löchelt M, Münk C. 2010. Vif of feline immunodeficiency virus from domestic cats protects against APOBEC3 restriction factors from many felids. *J. Virol.* 84: 7312-7324.

11. RINGRAZIAMENTI

Tutto questo è dedicato a mia mamma, è per te...quanto vorrei che tu fossi qui a gioire di questo traguardo...anche se non ti vedo so che ci sei, da qualche parte, tra la mia anima e il mio cuore...sei il fuoco che scorre nelle mie vene e che mi fa andare avanti ogni giorno, bello o brutto che sia...

Desidero ringraziare il Prof. Palù, per avermi dato l'opportunità di svolgere il dottorato presso il Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche.

Un grazie particolare alla Prof.ssa Parolin per la sua gentilezza, la sua competenza, la sua fiducia e per avermi offerto la possibilità di lavorare nel suo gruppo di ricerca.

Ringrazio Arianna e Claudia per mille cose...non so neanche da che parte iniziare... magari non ci crederete, ma molto di quello che è presente in questa tesi è frutto dei continui stimoli che mi date, della passione che avete nel fare questo lavoro che, insieme alla Prof, mi avete trasmesso...Grazie di cuore.

Ed infine ringrazio tutti coloro che fanno parte e hanno fatto parte del Dipartimento per aver condiviso con me questa esperienza!

Un grazie particolare va alla mia famiglia e ai miei amici, per avermi sostenuto anche nei momenti più difficili!

Grazie Lucia...chiudo gli occhi e sento che / ogni giorno insieme a te / avrò il coraggio di sorridere / se scendono due lacrime / apro gli occhi e tu ci sei / e sei come mi vorrei / come un miracolo la vita è qui davanti a me...non voglio che cambi, resta come sei!

Michele

12. PUBBLICAZIONI ALLEGATE

Parte della ricerca condotta durante questo dottorato è stata oggetto di pubblicazioni di seguito allegate:

Calistri A, Del Vecchio C, Salata C, Celestino M, Celegato M, Göttlinger H, Palù G, Parolin C. 2009. Role of the Feline Immunodeficiency Virus L-domain in the presence or absence of Gag processing: involvement of ubiquitin and Nedd4-2s ligase in viral egress. *J. Cell. Physiol.* 218: 175-82.